

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Bruno Cvjetičanin**

**Učinak koštanoga morfogenetskoga  
proteina na remodeliranje miokarda  
u modelu akutnoga infarkta miokarda  
u štakora**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2015.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Bruno Cvjetičanin**

**Učinak koštanoga morfogenetskoga  
proteina na remodeliranje miokarda  
u modelu akutnoga infarkta miokarda  
u štakora**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2015.**

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za mineralizirana tkiva,  
Zavoda za anatomiju, Medicinskoga fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Voditelj rada:

akademik prof dr.sci. Slobodan Vukičević

Mentoru akademiku Slobodanu Vukičeviću zahvaljujem na ideji koju smo zajednički pretočili u ovaj rad. Brojni razgovori, razmjene razmišljanja, stavova i pogleda kao i veliko iskustvo u radu, znanosti, medicini i životu općenito doprinjeli su neizmjereno izradi ove disertacije.

Zahvaljujem prof. dr.sc. Lovorki Grgurević na praktičnim idejama i savjetima tijekom izvođenja pokusa kao i pri pisanju samoga rada.

Iskrena hvala svim djelatnicama i djelatnicima Laboratorija za mineralizirana tkiva Zavoda za anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, posebno tehničarkama Đurđi Car i Mirjani Palčić, na svekolikoj pomoći kod izvođenja pokusa, tretmana eksperimentalnih životinja i izradi histoloških preparata, te imunohistokemijske analize.

Prof.dr. sc. Jasminki Jakić Razumović i dr. sc. Ivi Brčić hvala na angažmanu i savjetima prilikom obrade i analize patohistoloških uzoraka.

Prof. dr. sc. Dunji Rogić zahvaljujem na pomoći pri izvođenju biokemijskih analiza u ovom istraživanju.

Neizmjereno zahvaljujem dr Ivi Dumić-Čule koji je bio angažiran od prvog dana te koji je od početne ideje, prvih napisanih riječi i dobivenih rezultata kao i tijekom dugotrajnih i složenih pokusa i ponavljanja ustrajao silnom energijom i upornošću i tako ključno pridonesao uspješnom završetku.

Zahvaljujem također svim svojim kolegama sa Zavoda za plastičnu i rekonstruktivnu kirurgiju KBC Zagreb, posebno pročelniku prof. dr sci. Davoru Mijatoviću na strpljenju i podršci tijekom moga rada na ovome projektu.

Hvala dr. sci. Kristijanu Kunjku na praktičnoj pomoći pri pisanju disertacije.

Zahvaljujem svojim roditeljima koji su mi od prvog dana života podrška u svim mojim privatnim i profesionalnim koracima te su nesebično se žrtvujući pridoneli mom uspjehu ,koji je ujedno i njihov, pokazujući neizmjernu ljubav i povjerenje.

Hvala Zrinki Čorak Cvjetičanin na svemu u proteklih 10 godina.

*Disertaciju posvećujem svojoj djeci, Petri i Roku, mojem trajnom veselju i inspiraciji.*

## SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
1.1.	Anatomija ljudskog i štakorskog srca.....	1
1.2.	Akutni infarkt miokarda.....	6
1.2.1.	Definicija i podjela.....	6
1.2.2.	Epidemiologija.....	11
1.2.3.	Patofiziologija .....	13
1.2.4.	Dijagnostika .....	16
1.2.5.	Liječenje akutnog infarkta miokarda.....	19
1.2.6.	Komplikacije, sekundarna prevencij i prognoza.....	24
1.3.	Koštani morfogogenetski proteini .....	28
1.3.1.	Struktura i podjela koštanih morfogogenetskih proteina .....	30
1.3.2.	Mehanizam djelovanja i biološka uloga .....	32
1.3.3.	Koštani morfogogenetski protein1 (BMP1) .....	38
1.4.	Remodeliranje miokarda poslije infarkta, izvanstanični matriks i fibroza .....	48
2.	HIPOTEZA .....	56
3.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	57
4.	MATERIJALI I METODE .....	58
4.1.	Štakorski model infarkta miokarda.....	58
4.2.	Pokusne životinje.....	58
4.3.	Uvjeti smještaja laboratorijskih životinja tijekom pokusa.....	59
4.4.	Proizvodnja i primjena monoklonskih protutijela.....	60
4.5.	Mjerenje plazmatske koncentracije specifičnih srčanih enzima.....	60
4.6.	Ehokardiografska evaluacija srčane funkcije.....	61
4.7.	Patohistološka evaluacija miokarda.....	62
4.8.	Statistička analiza.....	62
4.9.	Prikaz redoslijeda istraživanja.....	63
5.	REZULTATI .....	64
5.1.	Promjene vrijednosti srčanih enzima i ultrazvučnih parametara u životinja nakon eksperimentalno izazvanog akutnog infarkta miokarda .....	64

5.2.	Promjena vrijednosti srčanih enzima i ultrazvučnih parametara uz primjenu specifičnih BMP1-3 protutijela nakon eksperimentalno izazvanog akutnog infarkta miokarda .....	71
6.	RASPRAVA.....	82
7.	ZAKLJUČAK.....	89
8.	SAŽETAK.....	90
9.	SUMMARY.....	91
10.	LITERATURA.....	92
11.	ŽIVOTOPIS.....	102

## POPIS KRATICA

AIM	-	akutni infarkt miokarda
BMP	-	koštani morfogenetski protein
BMS	-	bare metal stent
ECCM	-	ekstracelularni kolagenski matriks
IM	-	infarkt miokarda
IZ	-	infarcirana zona
LV	-	lijevi ventrikul
MMP	-	matriks metaloproteinaze
MR	-	mitralna regurgitacija
NIZ	-	neinfarcirana zona
NSTEMI	-	infarkt miokarda bez ST elevacije
PCI	-	perkutana koronarna intervencija
STEMI	-	infarkt miokarda sa ST elevacijom
TGF	-	transformirajući faktor rasta
TIMMP	-	tkivni inhibitori matriks metaloproteinaza

## 1.UVOD

### 1.1. Anatomija ljudskog i štakorskog srca

Srce je dvostruka mišićna pumpa, učinkovita, pouzdana i dugotrajna; tjera krv kroz krvne žile koje ju onda raznose po čitavom tijelu. Ukupno više od 6000 litara krvi dnevno prođe kroz srce i cirkulira krvotokom opskrbljujući tkiva prehranbenim tvarima i kisikom te izlučujući otpadne tvari staničnog metabolizma. Svaki je poremećaj srčane funkcije potencijalno smrtonosan.

Odraslo ljudsko srce teži oko 250-350 grama. Tipično je veličine šake, visine oko 12 cm te širine oko 8 a debljine oko 6 cm (1).

U srčanom radu postoje dvije faze: sistola, kada se krv izbacuje iz srca i diastola, kada je srčani mišić opušten te se srce puni krvlju.

Srce se dijeli na desno srce, koje pumpa krv malog krvotoka, te lijevo srce odgovorno za veliki krvotok. Svaka strana srca je građena od pretkljetke i kljetke. Krv u pretkljetke srca dolazi krvnim žilama, potom odlazi u kljetke te iz njih ponovo u krvotok. Sam oblik srca sličí trostranoj piramidi kojoj plohe bez oštih rubova prelaze jedna u drugu. Velike krvne žile koje izlaze iz srca tvore srčanu krunu. Na vanjskoj strani srca kljetke i pretkljetke dijeli brazda, *sulcus coronarius*, u kojoj su smještene koronarne arterije. One su odgovorne za metaboličku opskrbu snažnog srčanog mišića koji za pravilan rad ima velike energetske zahtjeve. Srce prehranjuju dvije srčane arterije: desna i lijeva koronarna arterija. Obje su grane uzlazne aorte i polaze iz zatona aortalnog zalistka. Prolaze koronarnim žlijebom te se u njemu i granaju.



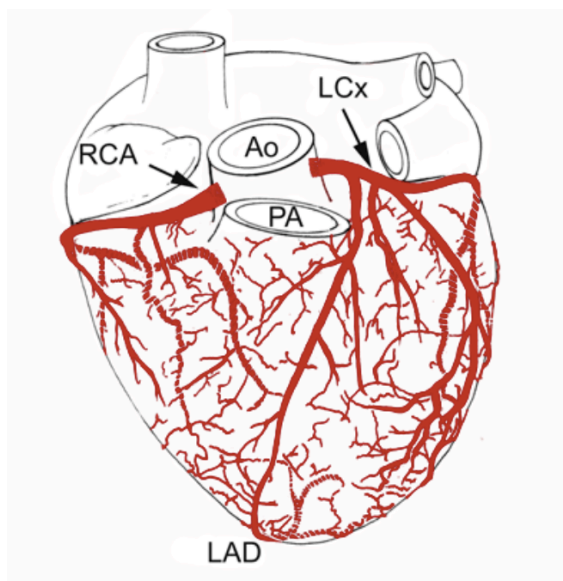
Desna koronarna arterija ljudskog srca polazi iz desnog aortalnog zaslona. Usmjerena je prema desnoj strani te dolazi na stražnju stranu srca. Daje ogranke za *conus arteriosus*, desnu pretklijetku, sinuatrijski čvor, za stijenku desne klijetke te preko najvećeg ogranka i za mišićni sloj interventrikularne pregrade kao i za atrioventrikularni čvor.

Lijeva koronarna arterija ljudskog srca polazi iz lijevog aortalnog zatona ulijevo i straga. Dolazi na prednju stranu srca gdje se dijeli na dva veća ogranka: prednju interventrikularnu i cirkumfleksnu arteriju.

Prednji interventrikularni ogranak leži u prednjem interventrikularnom žlijebu i dopire do vrha srca, zavija oko njega i dolazi na stražnju stranu. Cirkumfleksni ogranak je usmjeren lijevo i straga te se potom spušta po lateralnoj i stražnjoj stijenci. Obično anastomozira s ograncima desne koronarne arterije (2).

Međutim, s kliničkog stajališta, postoje 4 glavne koronarne arterije koje se zovu: lijeva koronarna arterija (LCA), lijeva prednja silazna (LAD) i lijeva kružna (LCX) arterija (koje su sve grane lijeve koronarne arterije) te desna koronarna arterija (RCA) (Slika 1).

Desna koronarna arterija opskrbljuje desni atrij, desni ventrikul, interventrikularni septum i sinuatrijski i atrioventrikularni čvor. Lijeva koronarna arterija opskrbljuje veći dio lijevog srca, prednju polovicu septuma uključujući i atrioventrikularni snop. Na srcu razlikujemo tri sloja: endokard, epikard i miokard.



*Slika 1. Shematski prikaz koronarne cirkulacije ljudskog srca (prilagođeno iz Gray's anatomy, 2000.)*

*RCA-desna koronarna arterija, LCx-lijeva kružna arterija, LAD-lijeva prednja silazna arterija, Ao-aorta, PA-plućna arterija*

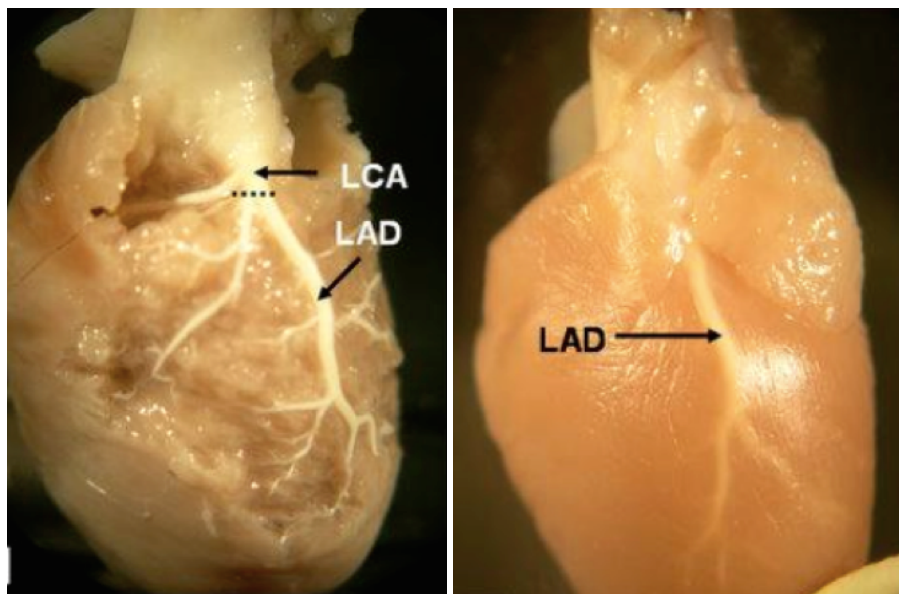
Endokard oblaže unutarnju stranu srca i odgovara endotelu krvnih žila. Podvostručenja endokarda izgrađuju listove arterijskih i atrioventrikularnih zalistaka. Epikard oblaže površinu srca i odgovara visceralnom listu perikarda. Miokard je srčano mišićje koje se značajno svojom građom razlikuje od skeletnog mišića. vlakna srčanog mišića granaju se i međusobno spajaju oblikujući mrežu. Stanična mreža postavljena je u sredini vlakna. Srčani mišić nije voljno kontroliran nego je pod nadzorom autonomnog živčanog sustava. Dva su tipa srčanog mišićja: radno - koje izgrađuje atrijsko i ventikularno mišićje i obavlja ulogu srčane pumpe, čini oko 99% ukupne srčane mase te provodno - provodi podržaj kroz srce i usklađuje rad svih srčanih dijelova i čini manje od 1 % mase srca.

Ultrastrukturalno srčane se stanice sastoje od sarkoleme, sarkoplazmatskog retikuluma, sistema tubula, jezgre i mitohondrija. Miofilamenti koji čine

kontraktilne elemente miocita raspoređeni su u snopiće tj. miofibrile. Sarkomera, temeljna funkcionalna jedinica kontraktilnog aparata sastoji se od debelih i tankih filamenata. Debeli su filament građen od miozina dok su tanki građeni od aktina s tropomiozinom i troponinom (3).

Štakorsko srce teži oko 600-800 mg. Veličine je u prosjeku oko 1,5 cm u dužini te do 1 cm u promjeru (4).

Desna koronarna arterija u štakora polazi s korijena aorte te gotovo odmah daje debeli ogranak, septalnu arteriju. Desna koronarna arterija zatim nastavlja svoj tijek po površini desne klijetke završavajući na posteriornoj površini desne klijetke blizu vrška srca. Opskrbljuje desnu klijetku, veći dio interventrikularnog septuma te mali dio desne strane prednje površine lijeve klijetke. Lijeva koronarna arterija nakon svog ishodišta iz aorte ima usmjeren tok ulijevo po granici između pretklijetke i klijetke te se podijeli na dvije grane. Prednja interventrikularna arterija slijedeći interventrikularni žlijeb do kraja blizu vrška srca opskrbljuje prednji dio interventrikularne pregrade s granama koje anastomoziraju sa septalnom arterijom. Drugi ogranak je cirkumfleksna arterija s tijekom po prednjoj površini srca prema lijevoj strani te završetkom na stražnjoj strani lijeve klijetke u blizini vrška srca. Opskrbljuje lijevi rub i stražnju površinu lijevog ventrikula (5) (Slika 2).



*Slika 2. Anatomski prikaz koronarne cirkulacije štakorskog srca  
LCA-cirkumfleksna arterija, LAD- lijeva prednja silazna arterija*

Krvna opskrba stražnje površine štakorskog srca potiče od cirkumfleksne i desne koronarne arterije. Treći primarni ogranak lijeve koronarne arterije nije učestao u štakorskog srca, postoji kod 6 -8% životinja (6). Važno je napomenuti da prethodno opisani anatomske odnosi za pojedine vrste odgovaraju u prosjeku za 50% jedinki dok su kod ostalih prisutne anatomske varijacije. Zbog toga su razlike među vrstama u nekim slučajevima i manje. Brojni radovi i eksperimentalni pokusi dokazali su da je štakorsko srce prihvatljiv model za usporedbu s ljudskim te se redovito koristi u proučavanju fiziologije i patoloških stanja, također i u primjeni novih terapijskih metoda.

## **1.2. Akutni infarkt miokarda**

### **1.2.1. Definicija i podjela**

Akutni koronarni sindrom je spektar kliničkih simptoma uzrokovanih naglim poremećajem krvotoka u koronarnim arterijama, koji vode do ishemije odgovarajućeg dijela miokarda. Obuhvaća infarkt miokarda sa ST-elevacijom na EKG-u (STEMI, engl. ST elevation myocardial infarction) infarkt miokarda bez ST-elevacije (NSTEMI, engl. non-ST elevation myocardial infarction) te nestabilnu anginu pectoris. STEMI je najteži oblik akutnog koronarnog sindroma u kojem ishemija zahvaća sva tri sloja srčanog mišića (endokard, miokard i epikard) te je najčešće posljedica potpune trombotske okluzije. Ishemija kod infarkta miokarda bez ST-elevacije i nestabilne angine pectoris nastaje uslijed neokluzivnog tromba i ne obuhvaća sve slojeve srčanog mišića. Lokalizacija i veličina infarkta ovise o arteriji koja je zahvaćena i postojanju kolateralnog krvotoka.

Povijesno infarkt miokarda (IM) nije bilo jednostavno definirati budući da ga se može promatrati iz više perspektiva kao što je klinička, elektrokardiografska, patološka, epidemiološka ili biokemijska. Najčešće se koristila definicija Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, engl. World Health Organization) koja zahtijeva prisustvo najmanje dvaju od tri kriterija: simptome miokardijalne ishemije, povišenje srčanih enzima u krvi te tipičan EKG s Q valovima i promjenama T valova (7).

S ciljem preciznijeg i klinički orijentiranog dijagnosticiranja infarkta miokarda, 2000. godine je predstavljena nova definicija kojom se svaka nekroza u okviru miokardijalne ishemije smatra infarktom miokarda (8). Daljnjom je raspravom dokumentom iz 2007. godine (9) donesena univerzalna definicija infarkta miokarda koja je prihvaćena od strane European Society of Cardiology (ESC), the American College of Cardiology Foundation (ACCF), The American Heart Association (AHA), The World Heart Federation (WHF), te World Health Organization (WHO). Međutim, zahvaljujući napretku biokemije koja je omogućila neusporedivo osjetljiviju i specifičniju dijagnostiku, na posljednjoj održanoj radnoj skupini 2012. godine zajedničkom odlukom ESC, ACCF, AHA i WHF u postojećem je dokumentu naglašena činjenica da biokemijski markeri mogu detektirati minimalnu ozljedu ili nekrozu miokarda. Prema toj Trećoj univerzalnoj definiciji, termin „akutni infarkt miokarda“ trebalo bi koristiti kada postoje dokazi o nekrozi miokarda kod bolesnika kojima klinička slika odgovara akutnoj ishemiji miokarda. U tome slučaju, bilo koji od navedenih kriterija u Tablici 1. dovoljan je za dijagnozu infarkta miokarda (10).

*Tablica 1. Kriteriji za akutni infarkt miokarda (10)*

- ❖ Porast i/ili pad vrijednosti srčanih biomarkera (po mogućnosti srčanog troponina), s najmanje jednom vrijednosti iznad 99. percentila gornje referentne vrijednosti, te s još jednim od sljedećih obilježja:
  - simptomi ishemije
  - novonastale (ili pretpostavljeno novonastale) značajne promjene ST segmenta – T vala ili novootkriveni blok lijeve grane
  - razvoj patološkog Q vala na EKG-u
  - dokaz novog gubitka vitalnog miokarda ili novog regionalnog poremećaja gibanja stijenke srca uz pomoć slikovnih metoda dijagnostike
  - pronalazak intrakoronarnog tromba angiografijom ili obdukcijom
- ❖ Kardijalna smrt sa simptomima koji upućuju na ishemiju miokarda i pretpostavljene novonastale ishemijske promjene, ili novonastali blok lijeve grane, međutim sa smrtnim ishodom koji je nastupio prije povišenja vrijednosti biomarkera ili prije njihovog uzimanja
- ❖ IM povezan s perkutanom koronarnom intervencijom (PCI) je definiran porastom vrijednosti cTn (>5 puta iznad 99. percentila) kod pacijenata s normalnim početnim vrijednostima ( $\leq$ 99-og percentila) ili povećanje vrijednosti cTn više od 20% ukoliko su početne vrijednosti bile povišene i stabilne su ili u padu. Uz to, potrebna je prisutnost jednog od sljedećeg:
  - simptoma koji upućuju na ishemiju miokarda
  - novonastale ishemične promjene na EKG-u

- angiografski nalaz koji govori u prilog proceduralnih komplikacija
  - novonastali gubitak vitalnog miokarda ili novonastali poremećaj regionalne pokretljivosti vidljiv na slikovnim metodama dijagnostike
- ❖ IM povezan s trombozom stenta otkriven koronarnom angiografijom ili autopsijom uz prisutne znakove ishemije miokarda i s porastom i/ili padom vrijednosti srčanih biomarkera s najmanje jednom vrijednosti iznad 99. percentila
- ❖ IM povezan s koronarnim arterijskim by-pass graftom (CABG) definiran je kao povišenje vrijednosti srčanih biomarkera ( $> 10$  puta iznad 99. percentila gornje referentne vrijednosti) kod pacijenata s normalnim početnim vrijednostima cTn ( $\leq 99.$  percentila). Uz to, nužna je prisutnost barem jednog od sljedećeg:
- novonastali patološki Q valovi ili novonastali blok lijeve grane
  - angiografski dokazana novonastala okluzija grafta ili native koronarne arterije
  - novonastali gubitak vitalnog miokarda ili novonastali poremećaj regionalne pokretljivosti vidljiv na slikovnim metodama dijagnostike

Za potrebe hitnog zbrinjavanja, najjednostavnija je sljedeća podjela IM: Akutni infarkt miokarda sa ST elevacijom (STEMI), akutni infarkt miokarda bez ST elevacije (NSTEMI), Q-val IM te non Q-val IM. Navedena podjela temelji se na elektrokardiografskom nalazu u dvama susjednim odvodima.

Daljnja podjela ovisno o kliničkim, patološkim i prognostičkim razlikama, te strategijama zbrinjavanja dijeli se na 5 tipova:



Tip 1 - Spontani IM – stanje povezano s oštećenjem aterosklerotskog plaka, te posljedičnim stvaranjem intraluminalnog tromba u jednoj ili više koronarnih arterija što dovodi do smanjenog protoka krvi ili trombocitnog embolusa u distalnijem dijelu koronarnih arterija. Tip 2. - IM kao posljedica ishemijske neravnoteže – slučajevi ozljede miokarda s nekrozom kod koje stanje uz koronarnu bolest dovodi do neravnoteže između „ponude i potražnje“ miokarda za kisikom npr. spazam koronarnih krvnih žila, embolija koronarnih krvnih žila, tahii/bradi aritmije, anemija, zatajenje disanja, hipo tenzija, te hipertenzija sa ili bez hipertrofije lijevog ventrikula. Tip 3. - IM koji rezultira odumiranjem srčanog mišića prije nego su dostupni laboratorijski nalazi biomarkera – u slučajevima kada simptomi upućuju na ishemiju srčanog mišića, te su prisutne nove promjene u EKG-u u smislu ishemije ili novootkrivenog bloka lijeve grane, međutim već je došlo do odumiranja stanica miokarda, prije nego je došlo do porasta biomarkera za IM. Tip 4 i 5. - IM povezan s nekim od pokušaja revaskularizacije (perkutana koronarna intervencija ili premosnica koronarne arterije) (11).

### 1.2.2. Epidemiologija

Akutni infarkt miokarda veliki je javnozdravstveni problem u cijelome svijetu, a vodeći je uzrok smrtnosti u visokoindustrijaliziranim zemljama. Usprkos značajnom tehnološkom napretku posljednjih desetljeća, 17,3 milijuna ljudi u svijetu je 2010. godine umrlo od posljedica kardiovaskularnih bolesti, što je oko 30% ukupno umrlih. Od toga je 7,3 milijuna ljudi umrlo od koronarne bolesti srca, dakle oko 10 % ukupno umrlih (12).

Incidencija infarkta miokarda raste s godinama života, u razvijenim zemljama iznosi 5/1000 godišnje, međutim ovisi o predisponirajućim faktorima za aterosklerozu. Smatra se da postoji šest primarnih rizičnih faktora za razvoj ateroskleroze koronarnih arterija i IM. Prisustvo bilo kojega je povezano s udvostručenjem relativnog rizika za razvoj bolesti (13).

1. Hiperlipidemija – povišene vrijednosti ukupnog kolesterola, LDL-a i triglicerida, kao i vrijednosti HDL-a niže od 40 mg/dL povećavaju rizik koronarne ateroskleroze.
2. Diabetes Mellitus – ubrzava proces ateroskleroze i negativno utječe na lipide općenito.
3. Hipertenzija – dokazano je da je rizik IM uvelike smanjen medikamentnom kontrolom krvnog tlaka (14)
4. Pušenje – uzrokuje oštećenje krvnih žila koje potiče formiranje ateroskleroze, te povećava rizik IM.
5. Muški spol – incidencija IM i ateroskleroze je veća kod muškaraca u svim dobnim skupinama.
6. Obiteljska anamneza.

Prema podacima American Heart Association (AHA) iz 2014. godine, (15) 15,4 milijuna Amerikanaca starijih od 20 godina boluje od koronarne bolesti srca, što je 6,4% stanovništva. Prevalencija je veća kod muškaraca (7,9%) u odnosu na žene (5,1%). Zabrinjavajuća su predviđanja za 2030.

godinu, kada se očekuje da će čak 18% stanovništva bolovati od koronarne bolesti srca. Procijenjena godišnja incidencija novih IM u SAD-u (prva hospitalizacija ili smrt uslijed infarkta) je 620 000, dok je incidencija rekurentnih IM 295 000. Valja uzeti u obzir da se oko 21% IM smatra „tihima“, dakle bez simptoma. Prosječna dob prvog infarkta kod muškaraca je 64,9 godina, dok je kod žena 72,3 godine. Incidencija infarkta miokarda sa ST-elevacijom je 1997. godine iznosila 121/100 000, te je u stalnom padu (2005. godine iznosila je 77/ 100 000.) Međutim, u istome vremenskom razdoblju vidljiv je porast infarkta miokarda bez ST-elevacije sa 126 na 132/100 000 (16).

Koronarna bolest srca bila je uzrok svake šeste smrti u SAD-u 2010. godine. Čak 50% muškaraca i 64% žena koji umru uslijed koronarne srčane bolesti nemaju prije toga nikakvih simptoma. Ishemijska bolest srca vodeći je uzrok smrtnosti i u Republici Hrvatskoj. 2013. godine od te bolesti umrlo je 10.772 ljudi, što je 21,38% umrlih (17).

### 1.2.3. Patofiziologija

Ishemija miokarda najčešće je posljedica smanjenog protoka krvi uslijed ateroskleroze, tromba ili spazma koronarnih arterija. Od navedenih mehanizama, najvažniji je ruptura ili erozija pokrovne ploče aterosklerotskog plaka. Ateroskleroza je proces kojim se formira plak u arterijama uglavnom srednjeg i većeg promjera. Brzina procesa aterosklerotskog suženja ovisi o nekoliko čimbenika kao što su dob, genetika, hipertenzija, hiperkolesterolemija, ali i način života (18). Aterosklerotične promjene endotela uzrokuju njegovu disfunkciju, te se smanjuje proizvodnja dušikovog monoksida (NO) koji sprječava agregaciju trombocita i vazokonstrikciju, kao i proizvodnja prostaciklina koji sprječava agregaciju trombocita (19). Disfunkcijom endotela i njegovom ozljedom, dolazi do nakupljanja monocita koji postaju aktivirani makrofagi, te proizvodnjom metaloproteinaza vode do razgradnje pokrovne ploče plaka, ali i citokinima privlače nove makrofage (20). Stabilnost samoga plaka ovisi o njegovim karakteristikama, te se viskorigičnim plakovima smatraju oni kojima je jezgra bogata lipidima, koji imaju tanak fibromuskularni pokrov, te relativno mnogo makrofaga i T limfocita u odnosu na glatke mišićne stanice (21). Takvi plakovi s upalnom komponentom nazivaju se vulnerabilnima jer je veća mogućnost njihove rupture, a značajna je i pozitivna korelacija C-reaktivnog proteina s brojem ruptura (22). Plak najčešće puca na rubovima, na mjestima gdje se spaja s endotelom. Iako ruptura može uzrokovati simptome akutnog koronarnog sindroma, čak u 99% slučajeva nema kliničkih simptoma (23). Nakon pucanja plaka, intravaskularni sadržaj dolazi u kontakt sa adhezivnim proteinima i

izvanstaničnim matriksom, što uzrokuje aktivaciju trombocita, otpuštanje proagregatornih medijatora, aktivaciju koagulacijske kaskade, te stvaranje trombina koji dalje stimulira agregaciju trombocita i aktivaciju endotelnih stanica. Rezultat toga je stvaranje tromba i subtotalna ili akutna okluzija arterije. Uzrok činjenici da je infarkt miokarda najčešći u jutarnjim satima cirkadijalne su promjene, naime u to vrijeme su agregabilnost trombocita i antifibrinolitički medijatori najjače izraženi.

Dvije su vrste tromba koje se mogu stvoriti. Bijeli tromb uglavnom tvore trombociti s vrlo malo fibrina te on nepotpuno ili intermitentno zatvara koronarnu arteriju. Upravo je on uzrokom nestabilne angine pectoris i infarkta miokarda bez ST elevacije. Za razliku od njega, crveni tromb bogat fibrinom s eritrocitima uzrokuje tipični infarkt miokarda sa ST-elevacijom s potpunom okluzijom arterije. U ovome su slučaju za razliku od infarkta miokarda bez ST-elevacije i nestabilne angine pectoris, zahvaćena sva tri sloja miokarda (24). STEMI nastaje okluzijom koronarne arterije uzrokovane tromбом koji je nastao rupturom aterosklerotskog plaka koji nije prije značajnije sužavao arteriju, ili kombinacijom otprije postojećeg aterosklerotskog suženja i okluzivnog tromba. Ako je proces suženja sporiji, moguć je nastanak kolateralne cirkulacije koja može smanjiti ishemiju i stupanj nekroze. Iako anastomoze između koronarnih arterija i dijelova iste koronarne arterije pri fiziološkim uvjetima nemaju veće značenje zbog promjera manjeg od 40  $\mu\text{m}$ , kod većeg suženja arterija protok kroz njih može biti i veći od onoga kroz suženu koronarnu arteriju.

Težina IM ovisi o nekoliko čimbenika : razini okluzije koronarne krvne žile, duljini trajanja okluzije, prisustvu ili odsutnosti kolateralne cirkulacije te

veličini samog IM. Što je bliže polazištu arterije, veličina infarkta je veća. Što je dulje vrijeme okluzije žile, veća je šansa nepovratne štete na miokardu distalno od okluzije. Što je kolateralni krvotok razvijeniji, veličina infarkta je manja. Što je veći IM, veća je i vjerojatnost smrtnog ishoda zbog mehaničke komplikacije srca ili zatajenje srca (25). Infarktom je najčešće zahvaćena lijeva klijetka, zbog veće potrebe za energijom i kisikom. Kod ishemije koja zahvaća sva tri sloja miokarda, nekroza se širi od endokarda prema epikardu te je konfluentna za razliku od fokalnih nekroza koje povezujemo s infarktom bez ST-elevacije. Vrijeme potrebno za razvoj nekroze ovisi o nekoliko čimbenika kao što su kolateralni krvotok, osjetljivost stanica na ishemiju i vrsta same okluzije. Smatra se da većina distalnog miokarda odumire nakon 6-8 sati okluzije koronarne arterije.

Infarkt miokarda dovodi do regionalnog poremećaja kontraktilnosti i time do gubitka funkcije zahvaćenog dijela miokarda. Već nakon dvije minute nakon zatvaranja koronarne arterije, zbog sistoličkog skraćanja i zadebljanja kontraktilnih elemenata, ishemični se dio mišića izbočuje umjesto da se kontrahira. Budući da se prema Frank-Starlingovu zakonu u neishemičnim dijelovima miokarda povećava kontraktilnost, dolazi do poremećaja hemodinamike. Istovremeno, dijastolička disfunkcija nastaje usporenjem izovolumne relaksacije, čime se usporava punjenje srca krvlju. Što je infarkt teži, on postaje klinički i hemodinamski manifestan u obliku popuštanja srca kao crpke ako u procesu kontrakcije zaostaje 20-25% mase miokarda lijeve klijetke. Gubitak funkcije većeg dijela može dovesti do teškog oblika zatajenja srca i razvoja kardiogenog šoka.

## **1.2.4 Dijagnostika**

### **1.2.4.1. Fizikalni pregled i klinička slika**

Fizikalni pregled iznimno je važan kako bi se isključili drugi uzroci boli u prsištu poput plućne embolije, perikarditisa, disekcije aorte, pneumotoraksa, pneumonije i dr. Samo na temelju simptoma, nemoguće je razlikovati infarkt miokarda sa ST-elevacijom od onoga bez ST-elevacije. Tipični su simptomi infarkta miokarda retrosternalni pritisak koji se širi u lijevu ruku, vrat ili vilicu. Ti simptomi često su popraćeni znojenjem, mučninom, boli u abdomenu, otežanim disanjem i sinkopom (26). Međutim, može se prezentirati i atipičnom slikom češćom u mlađoj populaciji (25-40 godina), starijoj populaciji (iznad 75 godina), kod žena, dijabetičara ili pacijenata s kroničnim renalnim zatajenjem, u obliku boli u epigastriju, oštre boli u prsištu, neobične žgaravice i sl. (27). U čak 30% pacijenata s infarktom miokarda sa ST-elevacijom, klinička je slika atipična (28). Pacijenti kod kojih su simptomi prisutni u mirovanju, koji imaju tahikardiju, hipotenziju ili srčano zatajenje imaju lošiju prognozu od onih kojima se simptomi javljaju kod fizičkih napora.

### **1.2.4.2. Elektrokardiogram (EKG)**

EKG je osnovni dijagnostički test kojega je potrebno učiniti unutar 10 minuta od prvog kontakta s pacijentom sa simptomima ishemije (29). Radi se o neinvazivnoj metodi gdje se na tijelo pacijenta postavljaju prilagođene elektrode koje mjere električni potencijal srca. Rezultati se bilježe na ispisu koji se kasnije detaljno analizira. Promjene u ST segmentu i T valu indikatori su nestabilnog akutnog koronarnog sindroma (30). Broj odvoda na kojima je

prisutna depresija ST segmenta ukazuje na opseg i težinu ishemije te samu prognozu (31). Važno je naglasiti da normalan nalaz EKG-a ne isključuje mogućnost ishemije, budući da su studije potvrdile da je kod 5% pacijenata nakon što su otpušteni iz hitne službe s nalazom normalnog EKG-a kasnije utvrđen akutni infarkt miokarda ili nestabilna angina (32).

#### **1.2.4.3. Laboratorijski testovi**

Stanice miokarda sadrže enzime i proteine (npr. kreatin kinazu, troponin I i T, mioglobin) koji su povezani s određenim funkcijama u stanici. Nakon što nastupi smrti srčane stanice, gubitkom integriteta stanične membrane te tvari prelaze u krvotok, gdje se mogu detektirati biokemijskim testovima. Najvažniji markeri ozljede miokarda su troponin T i troponin I, zbog veće specifičnosti i senzitivnosti u usporedbi s drugim ranije korištenim markerima - kreatin kinaze i mioglobina (33). Kod pacijenata s infarktom miokarda, porast troponina u krvi je vidljiv nakon 3-4 sata, te ostaje povišen do 2 tjedna. Pacijenti bez ST-elevacije na EKG-u obično imaju nižu razinu troponina koja je detektabilna u kraćem vremenskom razdoblju. Važno je uzeti uzorak krvi za biokemijsku obradu i nakon 6-12 sati od prijema i ako se bol u prsištu ponovi, budući da prvi negativan nalaz ne isključuje ishemiju (34). Ipak, treba uzeti u obzir da povišenje troponina u krvi mogu uzrokovati i druga stanja poput disecirajuće aneurizme aorte ili plućne embolije, kroničnog renalnog zatajenja ili miopatija koje je u diferencijalnoj dijagnozi potrebno isključiti.



#### **1.2.4.4. Ultrazvuk srca i neinvazivne dijagnostičke metode**

Ehokardiogram ili ultrazvuk srca je nužan u dijagnostici budući da se njime jednostavno može procijeniti sistolička funkcija lijeve klijetke koja je važan prognostički čimbenik infarkta miokarda. Također, ultrazvuk je koristan i u evaluaciji drugih stanja koja ulaze u diferencijalnu dijagnozu kao disekcija i stenoza aorte, plućna embolija ili hipertrofična kardiomiopatija (35). Ultrazvuk predstavlja također standardnu, neinvazivnu metodu u dijagnostici srčane patologije. Izvodi se tako da se postavlja ultrazvučna sonda na prsište te se rezultati promatranja i mjerenja prikazuju dinamički na ekranu u pravom vremenu. Također se osim same akcije srca i standardnih parametara srčane funkcije istim pristupom mogu mjeriti i protoci u srčanim šupljinama kao i u arterijama. Ako je dostupna, magnetska rezonanca može biti korisna u procjeni oštećenja srca (36) dok je scintigrafija miokarda od pomoći kod pacijenata s boli u prsištu bez promjena na EKG-u (37).

#### **1.2.4.5. Koronarna angiografija**

Bez obzira na napredak tehnologije, zlatni standard u dijagnostici još je uvijek invazivna koronarna angiografija. Angiografijom se točno može lokalizirati i procijeniti stupanj stenoze, a osim definitivne dijagnoze koronarne bolesti, omogućuje i planiranje liječenja. Pri tom postupku se duga uska cjevčica katetera provede od femoralne ili brahijalne arterije u uzlaznu aortu i potom se pod kontrolom rendgenske slike vrh katetera uvede u koronarnu arteriju i ubrizga radioaktivni kontrast. Protok krvi kroz koronarnu arteriju snima se na film u realnom vremenu i pritom se proučava mjesto i veličina krvnog suženja te planiraju moguće terapijske metode.

## **1.2.5. Liječenje akutnog infarkta miokarda**

### **1.2.5.1. Infarkt miokarda sa ST-elevacijom (STEMI)**

Rana mehanička reperfuzija perkutanom koronarnom intervencijom (PCI) ili fibrinolitičkom terapijom liječenje je izbora unutar 12 sati od početka simptoma kod pacijenata s kliničkom slikom infarkta miokarda sa ST-elevacijom koji imaju konstantno povišeni ST-segment ili novootkriveni blok lijeve grane (38). Reperfuzija je općenito prihvaćena i u pacijenata kod kojih je prisutna klinička slika ili dokaz na EKG-u da je ishemija u tijeku, čak i ako su se simptomi pojavili prije više od 12 sati (39). Brojne randomizirane kliničke studije pokazale su prednost PCI u usporedbi s bolničkom fibrinolitičkom terapijom (40). Primarna PCI u liječenju akutnog STEMI ima nižu stopu smrtnosti, ne-fatalnih reinfarkta i infarkta u usporedbi s fibrinolizom (41) , a indicirana je i u pacijenata s kongestivnim srčanim zatajenjem, plućnim edemom i hemodinamskom ili električnom nestabilnošću. Najveća mogućnost za smanjenje mortaliteta i morbiditeta leži u adekvatnoj intervenciji unutar prva 4 sata, a 90 minuta od nastanka prvih simptoma smatra se zlatnim standardom (42).

Upravo zbog primjene antitrombotičkih lijekova, krvarenje je češće kada se PCI izvodi tijekom akutnog koronarnog sindroma, posebno kada je u pitanju STEMI. Kod radijalnog pristupa, tendencija krvarenja i mortalitet su manji u usporedbi s femoralnim pristupom (43). Klinička ispitivanja pokazuju smanjenu potrebu za reintervencijom u 12 i 24-mjesečnom praćenju primjenom stentova obloženih sirolimusom i paklitakselom u usporedbi s „ogoljelim metalnim stentom“ (BMS – bare metal stent) (44). U tijeku su i

istraživanja novih generacija stentova obloženih imobilizirajućim antitijelima koja hvataju cirkulirajuće endotelne progenitorne stanice, te na taj način omogućuju brzu endotelizaciju i cijeljenje (45).

Fibrinoliza je važna strategija reperfuzije, poglavito kada nije moguće provesti PCI u preporučenom vremenskom okviru. Ipak, budući da je efikasnost je veća kod ranije provedbe terapije, idealno je vrijeme unutar 30 minuta. Kod 1000 pacijenata sa STEMI, fibrinolitička terapija provedena unutar 6 sati od početka simptoma sprječava 30 smrti više u usporedbi s placebom. Ipak, fibrinolitička terapija je povezana s malim, ali svejedno značajnim porastom moždanih udara, uglavnom u obliku intrakranijskih krvarenja (46). Svi fibrinolitički lijekovi imaju sličnu vjerojatnost izazivanja intrakranijskog krvarenja, od 0.5% do 1.5% (47). Brojne su apsolutne kontraindikacije za primjenu fibrinolitičke terapije: anamneza intrakranijskog krvarenja, ishemični moždani udar u zadnjih 6 mjeseci, ozljeda, neoplazma ili arteriovenska malformacija u centralnom živčanom sustavu, ozljeda ili trauma glave u zadnjih 3 tjedna, gastrointestinalno krvarenje u zadnjih mjesec dana, poznati poremećaj krvarenja, disekcija aorte, te biopsija jetre ili lumbalna punkcija unutar posljednjih 24 sata. Relativne su kontraindikacije prolazan ishemični udar u posljednjih 6 mjeseci, oralna antikoagulantna terapija, trudnoća ili 1 tjedan nakon poroda, refraktorna hipertenzija (sistolički tlak >180 mmHg ili dijastolički tlak >110 mmHg), uznapredovala bolest jetre, infektivni endokarditis, aktivni ulkus, te dugo ili traumatsko oživljavanje. Pacijenti kod kojih nije provedena reperfuzijska terapija unutar 12 sati od početka simptoma, ili kod pacijenata nakon 12 sati od početka simptoma, preporučuje se dati aspirin, clopidogrel i antitrombotski lijek što je prije moguće (48).

#### **1.2.5.2. Infarkt miokarda bez ST-elevacije (NSTEMI)**

Lijekovi koji umanjuju ishemiju oni su koji smanjuju potrebu miokarda za kisikom ili povećavaju opskrbu kisikom koronarnom vazodilatacijom.  $\beta$ -blokatori kompetitivno inhibiraju učinke cirkulirajućih katekolamina i smanjuju potrebu miokarda za kisikom smanjenjem srčane frekvencije, krvnog tlaka i kontraktilnosti. Nitrati uzrokuju venodilataciju, što smanjuje opterećenje srca, a time i njegovu potrebu za kisikom. Uz to, nitrati šire koronarne arterije i povećavaju kolateralni protok. Intravenusno su efikasniji u ublažavanju simptoma i ST depresije nego kada se daju sublingvalno (49). Kontraindicirani su kod pacijenata koji uzimaju inhibitore fosfodiesteraze (sildenafil, vardenafil, tadalafil) zbog mogućeg pada krvnog tlaka uzrokovanog značajnom vazodilatacijom. Blokatori kanala kalcija su koronarni vazodilatatori, zbog čega su lijek izbora kod vazospastične angine, a ovisno o tipu smanjuju i kontraktilnost i atrioventrikularnu vodljivost.

Antitrombotska terapija ključna je u liječenju budući da su uzrok arterijske tromboze upravo aktivacija i agregacija trombocita. Ta se terapija treba primijeniti u najkraćem mogućem intervalu od postavljanja dijagnoze kako bi se smanjile komplikacije. Tri su vrste lijekova s različitim mehanizmom djelovanja. Aspirin (acetilsalicilna kiselina) preko ciklooksigenaze (COX-1) sprječava stvaranje tromboksana A<sub>2</sub>, čime su trombociti trajno inhibirani. Preporučuje se svim pacijentima ukoliko nema kontraindikacija početna doza od 150-300 mg, te dugoročna od 75-100 mg dnevno, bez obzira na vrstu

liječenja. Međutim, budući da postoje i dodatni putevi agregacije, važni su i antagonisti P2Y<sub>12</sub> receptora jer se povezivanjem njega s ADP-om povećava aktivacija i agregacija trombocita. Tienopiridini (klopidogrel, prasugrel) ireverzibilno se vežu na P2Y<sub>12</sub> receptor, dok se noviji ticagrelor veže reverzibilno. P2Y<sub>12</sub> inhibitor se preporučuje dati uz aspirin što je prije moguće te s terapijom nastaviti sljedećih 12 mjeseci ukoliko nema kontraindikacija poput povećanog rizika krvarenja. Antagonisti GP IIb/IIIa djeluju na ostale putove aktivacije trombocita. Za kliničku uporabu odobrene su tri vrste: Abciximab koji je fragment monoklalnog antitijela, eptifibatide kao ciklički peptid te tirofiban koji je peptidomimetička molekula. Svi povećavaju rizik trombocitopenije (50).

Antikoagulansi inhibiraju stvaranje i aktivaciju trombina, a u kombinaciji s antitromboticima daju bolji terapijski odgovor nego pojedinačna individualna terapija. Nekoliko je vrsta tih lijekova koji imaju učinak na različitim točkama koagulacijske kaskade. Indirektnim inhibitorima koagulacije potreban je antitrombin za potpuni učinak. Fondaparinux indirektni je inhibitor faktora Xa, kao i heparin niske molekulske mase (LMWH) koji je uz to i indirektni inhibitor trombina. Direktni inhibitori faktora Xa su apixaban, rivaroxaban te otamixaban, a trombin direktno inhibiraju bivalirudin i dabigatran (51). Antikoagulacija se preporučuje kod svih pacijenata kao dodatak antitrombocitnim lijekovima, a odabir same vrste antikoagulantata temelji se na rizicima krvarenja i ishemije kod pacijenta. Fondaparinux (2,5 mg supkutano dnevno) ima najbolji omjer efikasnosti i sigurnosti u dozi, a ukoliko nije dostupan, preporučuje se enoxaparin. Heparin se primjenjuje ukoliko nisu dostupni navedeni lijekovi.

Koronarna revaskularizacija korisna je i kod infarkta miokarda bez ST-elevacije jer olakšava simptome, skraćuje boravak u bolnici te daje bolju prognozu. Indikacija i odabir same strategije (PCI ili CABG) ovise o stanju pacijenta, čimbenicima rizika te komorbiditetima. Primarni kriteriji visokorizičnih pacijenata s indikacijom invazivne strategije relevantan su porast ili pad troponina te dinamičke promjene ST-segmenta ili T vala, bez obzira na simptome. Sekundarni kriteriji su postojeća renalna insuficijencija, dijabetes, smanjena funkcija lijeve klijetke, rana postinfarktna angina te nedavni PCI ili već učinjeni CABG.

Prema tome, invazivni pristup unutar 72 sata od početka simptoma preporučen je pacijentima s barem jednim kriterijem visokog rizika i ponavljajućim simptomima. Hitna koronarna angiografija (unutar prva 2 sata) preporučuje se pacijentima koji imaju velik rizik za ishemiju (kod ponavljajuće angine, udruženog srčanog zatajenja, teških ventrikularnih aritmija ili hemodinamske nestabilnosti) (52).

### **1.2.6. Komplikacije, sekundarna prevencija i prognoza**

Akutni infarkt miokarda popraćen je nizom komplikacija koje uključuju ponovnu ishemiju, poremećaje ritma i provođenja (sinus tahikardiju i bradikardiju, fibrilaciju atrijske ili ventrikularne, ekstrasistole te pojave srčanih blokova), mehaničke komplikacije (zatajivanje lijeve klijetke, kardiogeni šok, aneurizme, rupturu ventrikula, interventrikularnog septuma ili papilarnog mišića, mitralnu regurgitaciju), emboličke komplikacije te upalne posljedice (perikarditis).

Ponovna ishemija reokluzijom arterije zahvaćene infarktom nakon fibrinolitičke terapije zahvaća 5-10% pacijenata do bolničkog otpusta te 25 do 35% pacijenata unutar jedne godine (53). Nakon perkutane koronarne intervencije (PCI) taj broj je znatno manji i iznosi 3% unutar 90 dana od IM (54). Oko 90 % pacijenata s AIM razvije neku vrstu aritmije tijekom ili neposredno nakon incidenta. U 25 % pacijenata takvi poremećaji ritma manifestiraju se u prva 24 sata. Preuranjene kontrakcije ventrikula pogađaju 90% pacijenata s akutnim infarktom miokarda, supraventrikularne aritmije su prisutne u njih 10%, dok je fibrilacija ventrikula prisutna u 2-4% pacijenata. Općenito je učestalost aritmija veća u pacijenata sa STEMI nego u pacijenta s NSTEMI (55).

Ruptura stijenke lijevog ventrikula, ruptura interventrikularnog septuma te razvoj mitralne regurgitacije kao komplikacije IM mogu dovesti do kardiogenog šoka i smrti, te je terapija najkorisnija ako se započne odmah. Smjernice American College of Cardiology/American Heart Association

(ACC/AHA) iz 2004 predlažu hitnu kiruršku intervenciju za navedene akutne komplikacije (56). Očekivana posljedica IM je poremećaj funkcije lijevog ventrikula, čiji stupanj ovisi o lokalizaciji i težini zahvaćenog miokarda. Upravo je stupanj poremećene funkcije lijevog ventrikula najznačajniji prognostički pokazatelj mortaliteta nakon infarkta miokarda. Kardiogeni šok javlja se u 6-10% svih STEMI te je vodeći uzrok smrtnosti kod infarkta miokarda (57). Mortalitet ovisi o stupnju poremećaja funkcije ventrikula i mitralne regurgitacije (58).

Akutna ili subakutna ruptura stijenke lijevog ventrikula ozbiljna je i često smrtonosna komplikacija AIM. To je i najčešći oblik rupture miokarda koja se javlja u 3% oboljelih. Relativno se često pronalazi kod pacijenata preminulih od IM, u nekim većim studijama pronađeno je čak 16-24% ruptura lijevog ventrikla na obdukciji takvih pacijenata (59). U 50% pacijenata s rupturom, ona nastaje unutar 5 dana, a u 90% njih unutar 2 tjedna od infarkta. Čimbenici rizika su starija životna dob, ženski spol, infarkt prednje stijenke, hipertenzija, te slabija kolateralna cirkulacija. Očituje se kardiorespiracijskim arestom s elektromehaničkom disocijacijom – električna aktivnost srca je održana, ali nema mehaničkog odgovora. Pseudoaneurizma nastaje ograničenom rupturom lijevog ventrikula, a njezinu vanjsku granicu čine perikardij i tromb. Značajna je zbog toga što spontano, bez simptoma rupt urira u trećine pacijenata. Učestalost rupture ventrikularnog septuma je 0,5 - 2% bolesnika s akutnim srčanim infarktom. Tipično se javlja oko 3 do 5 dana nakon AIM ali može se javiti već unutar 24 sata ili do čak 2 tjedna nakon IM. Bez kirurške terapije smrtnost je 24% prvoga dana, 46% prvoga tjedna, a 82% unutar 2 mjeseca. Akutna mitralna regurgitacija (MR) nakon AIM uključuje ishemijski



poremećaj papilarnih mišića, dilataciju lijevog ventrikula ili pravu aneurizmu ventrikula te rupturu korde ili papilarnog mišića. Lakša do srednje teška MR je prisutna u 13-45% pacijenata nakon IM (60). Ruptura papilarnog mišića javlja se u 1% pacijenata, a uzrokom je smrti u 1-5% pacijenata s infarktom miokarda.

Embolija je klinički vidljiva u manje od 2%, dok je muralni tromb prisutan u 20% pacijenata nakon infarkta miokarda (61). Najčešće se očituje moždanim udarom u prvih 10 dana nakon infarkta miokarda, ali može uzrokovati ishemiju udova, bubrega i mezenterijalni infarkt.

Rani perikarditis javlja se 1-3 dana nakon infarkta miokarda, a učestalost mu je 10%, dok se kasni perikarditis javlja u 1-3% pacijenata, 2-8 tjedana nakon infarkta miokarda (62).

Budući da pacijenti nakon infarkta miokarda imaju povećan rizik daljnjih kardiovaskularnih komplikacija, sekundarna je prevencija od iznimnog značaja. Iz studije OASIS-5 (63) vidljiva je važnost sekundarne prevencije kroz zdravu prehranu, redovitu fizičku aktivnost i prestanak pušenja. Kod pacijenata koji su se pridržavali dijeta i tjelovježbe te su prestali pušiti, rizik infarkta miokarda bio je znatno manji od skupine pacijenata koji se nisu toga pridržavali. Pušenje ima značajan protrombotski učinak te se prestankom pušenja nakon infarkta miokarda smrtnost smanjuje za gotovo 50%, zbog čega je to najznačajnija od svih metoda sekundarne prevencije (64). Također, osim promjena životnoga stila i kontrole čimbenika rizika, nužna je i farmakološka terapija. Kod pacijenata sa smanjenom funkcijom lijevog ventrikula, preporučuju se ACE inhibitori ili antagonisti adenozijskih receptora (ACE inhibitori), kao i antagonisti aldosterona (eplerenon) koji smanjuju

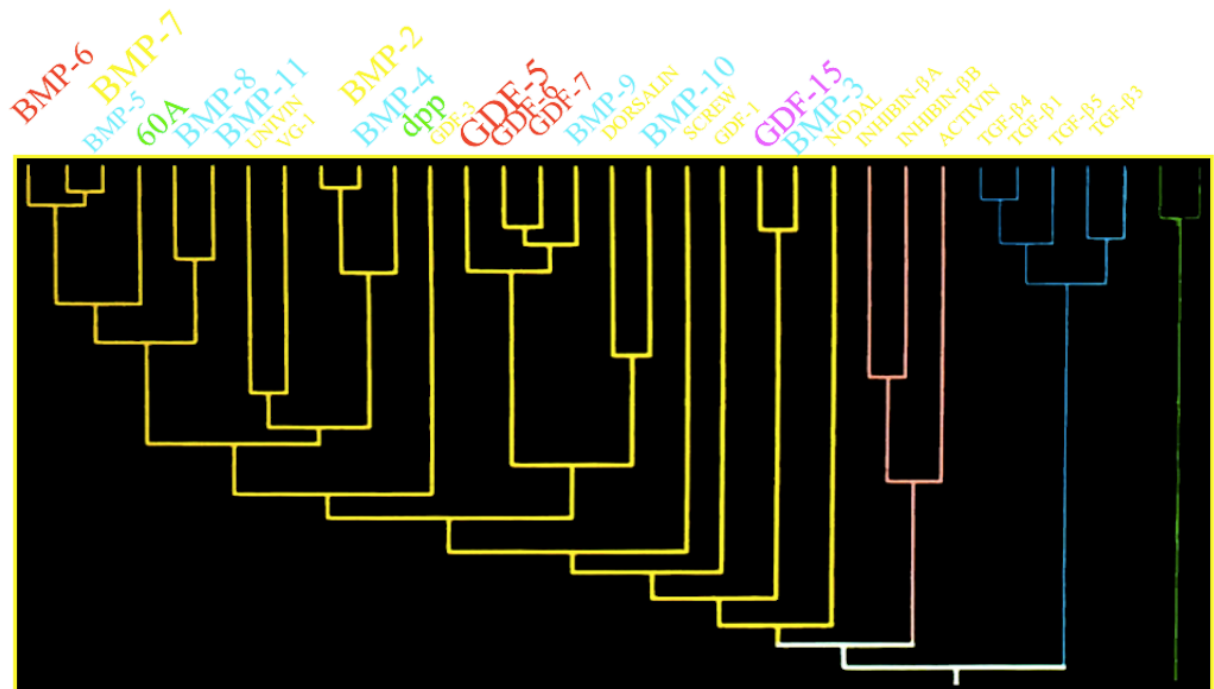
mortalitet nakon IM (65). Statini se preporučuju kod svih pacijenata nakon infarkta miokarda bez obzira na razinu kolesterola. Stroža kontrola vrijednosti kolesterola u terapiji ima učinak smanjenja rizika ponovnog infarkta kao i smrtnog ishoda (66). Povećano korištenje metoda reperfuzije i preventivna terapija beta blokatorima, aspirinom i statinima razlog je kontinuiranog pada stopa mortaliteta u posljednjih 30 godina (67). Smatra se da je trenutni kratkoročni mortalitet nakon svih akutnih koronarnih zbivanja (STEMI, NSTEMI i nestabilna angina) između 2 i 3% (68). Kod pacijenata podvrgnutih PCI unutar prva 2 sata od prijema u bolnicu, kratkoročni mortalitet iznosi 2-4% za NSTEMI, te 3-8% za STEMI (69). Stopa mortaliteta kroz dulji period također je u padu posljednjih 30 godina, međutim nešto su nepovoljnije kod pacijenata s NSTEMI te iznose između 5 i 9% (70).

### 1.3. Koštani morfogenetski proteini

Znanstvena istraživanja provedena krajem prošlog stoljeća na polju biologije koštanog tkiva i njegove strukture dovela su do otkrića potpuno nove obitelji molekula. Primjenjujući navedene molekule potkožno ili intramuskularno uočilo se da iste induciraju enhondralno stvaranje kosti na spomenutim ektopičnim mjestima (71). Upravo zbog svoga osteoinduktivnog djelovanja u samoj kosti, ali i ostalim tkivima, čitava ta skupina molekula nazvana je koštani morfogenetski protein (Bone morphogenetic protein - BMP) (72). Sposobnost induciranja nastanka koštanog tkiva samo je jedna od brojnih uloga navedenih molekula u raznim procesima u organizmu. Dokazana je naime i velika uloga u razvoju drugih organa i tkiva koji se stvaraju putem mezenhimsko-epitelnih međudjelovanja (73). Navedene molekule djeluju na različite vrste mezenhimalnih stanica modulirajući njihovu ekspresiju i potičući njihovo sazrijevanje (74). Pronađeni su također slični proteini poznati pod raznim imenima npr. hrskavični morfogenetski protein (Cartilage derived morphogenetic proteins - CDMP's) te faktori rasta i diferencijacije (Growth and differentiation factor - GDF). Svi su oni svrstani u molekule unutar obitelji BMP koje se do danas razvrstavaju od BMP2 do BMP16. Koštani morfogenetski proteini čine jedinstvenu obitelj unutar nadobitelji transformirajućeg čimbenika rasta  $\beta$  (TGF $\beta$ ) (Slika 3).

Važno je napomenuti da su proteini TGF $\beta$  nadobitelji identificirani u brojnim vrstama uključujući čovjeka, miša, vinsku mušicu i vrste afričke žabe *Xenopus* uz izrazito veliku podudarnost aminokiselinskih slijedova između samih vrsta

(75). Tako npr. podudarnost između miševa i ljudi u aminokiselinskom slijedu proteina BMP7 iznosi čak 98% (76). Svi članovi navedene nadobitelji pa tako dakle i BMP protein, građeni su kao dimerne molekule povezane disulfidnom vezom sastavljene od N-terminalne signalne sekvence, prodomene i zrele domene koja je smještena na karboksiterminalnom kraju. Jedinstveno obilježje čitave nadobitelji regija je sastavljena od sedam cisteinskih ostataka unutar zrele domene na terminalnom kraju čiji je položaj strogo očuvan unutar vrste.



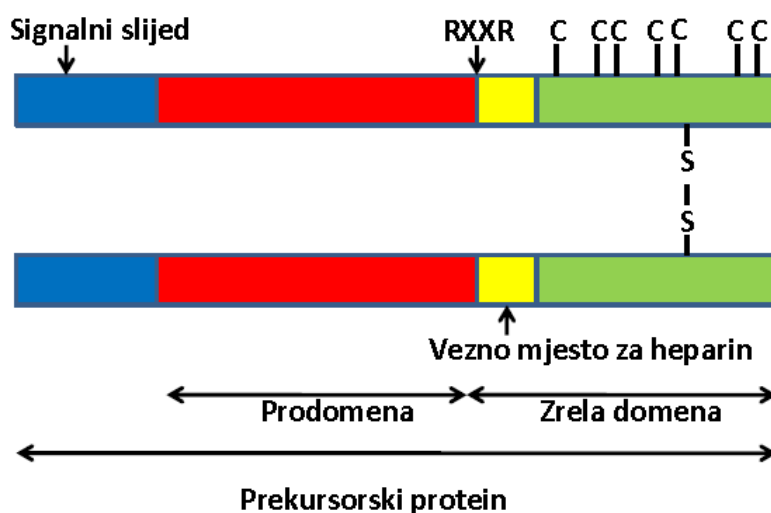
Slika 3: Članovi  $TGF\beta$  nadobitelji (transformirajućeg čimbenika rasta)

TGF $\beta$  molekule za razliku od BMP molekula nemaju sposobnost osteoindukcije ali su prilično aktivni u imunomodulaciji upalnog odgovora i čitavoj upalnoj reakciji, također i u procesu fibroze. S koštanim morfogenetskim proteinima pokazuju prosječnu podudarnost aminokiselina od oko 37% (77). Ostali članovi TGF $\beta$  obitelji se s BMP molekulama podudaraju u sekvenci aminokiselina u vrijednostima od 16 do 31%.

### **1.3.1. Struktura i podjela koštanih morfogenetskih proteina**

Sinteza koštanih morfogenetskih proteina odvija se unutar stanice. Nastaju od velikih prekursornih molekula sastavljenih od hidrofobnih sekrecijskih slijedova na aminoterminalnom kraju, osnovnog propeptidnog područja te karboksiterminalnog dijela sa sedam cisteinskih ostataka (78). U stanici kasnije proteolitičkim djelovanjem dolazi do formiranja zrelog dimernog oblika molekule povezanog disulfidnom vezom (Slika 4). U nekim slučajevima nastaju i heterodimerne molekule tj. molekule sastavljene od dvaju različitih BMP ili pak jednog BMP i nekog drugog člana TGF $\beta$  obitelji. Svi koštani morfogenetski proteini dolaze u glikoliziranom obliku tako da koštani morfogenetski protein -2 i -3 imaju jedno glikolizacijsko mjesto za asparaginsku kiselinu, BMP4 dva mjesta, a BMP5, -6, -7 i tri mjesta na određenim područjima. U inicijalnim istraživanjima otkriveno je osam različitih molekula koštanog morfogenetskog proteina koji su redom nazvani BMP1 do BMP8. Kasnijom detaljnijom molekularnom analizom pronađena je sličnost u strukturi 6 molekula BMP i time njihova pripadnost TGF $\beta$  nadobitelji. Za BMP1 se ispostavilo kako ne pripada navedenoj skupini, nego da se radi o enzimu,

prokolagen-C proteinazi. Temeljem analize sličnosti aminokiselinskog niza samih molekula koštanog morfogogenetskog proteina iste možemo podijeliti u 3 skupine. Prva se sastoji od molekula BMP2 i -4 gdje je podudarnost slijeda aminokiselina 92%. Drugoj skupini pripadaju BMP5, -6 , -7 i -8 čija je podudarnost oko 89% dok u zadnju skupinu pripada BMP3 koji nema jasnu osteoinduktivnu aktivnost, a sa BMP7 pokazuje sličnost u oko 42% aminokiselina.



Slika 4: Shematski prikaz proteinske strukture članova TGF- $\beta$  nadobitelji. C-cistein; S-sumpor, RxxR-mjesto odvajanja zrele domene od prodomene.

Geni za koštane morfogogenetske proteine široko su rasprostranjeni u čitavom ljudskom genomu kao i uostalom i za ostale članove TGF-  $\beta$  obitelji (79). To je vjerojatno pridonijelo tkivno-specifičnom djelovanju pojedinih članova obitelji. Tako npr. gen za BMP2 nalazi se na dvadesetom kromosomu, za BMP3 na četvrtom kromosomu, BMP4 na četrnaestom kromosomu, BMP5 i BMP6 na šestom kromosomu, BMP7 na dvadesetom kromosomu te BMP8 na prvom kromosomu. Za sve BMP molekule kao i

uostalom za čitavu TGF $\beta$  obitelj, karakteristično je da se radi o pleotropnim proteinima koji utječu na sve stanice (epitelne, monocite, neuralne) . Dakle, ekspresija BMP nije nađena strogo u koštanom tkivu već je specifična za sva tkiva (78).

### **1.3.2. Mehanizam djelovanja i biološka uloga**

Sve molekule TGF $\beta$  obitelji djeluju na stanice tako što se vežu na površinske receptore tipa I i II na ciljnim stanicama. Regulacija počinje izvan stanica na razini aktivacije molekula iz prekursornih kompleksa te njihovim međusobnim djelovanjem. Receptore tipa I i II ubrajamo u transmembranske serin/treonin kinaze. Aktivirani receptor tipa II fosforilira receptor tipa I na intracelularnom jukstamembranskom području molekule bogatom glicinom i serinom stvara se kompleks i nastaje posljedični prijenos signala (80). Samo djelovanje koštanih morfogenetskih proteina započinje vezanjem za dva različita tipa receptora: receptor BMP tipa IA (BMPRI-IA ili ALK-3) i tipa IB (BMPRI-IB ili ALK-6) u prisutnosti receptora BMP tipa II (BMPRII) (81). Osim na receptore ALK-3 ili ALK-6, molekule BMP2, -7 i GDF5 mogu se vezati i na aktivinski receptor tipa I (ActRI ili ALK-2). Receptori tipa I imaju veći afinitet za koštane morfogenetske proteine te prvi vežu svoje ligande i onda privlače receptore tipa II tvoreći na taj način heteromerni kompleks. Nakon toga receptor tipa II koji je konstitutivno aktivna kinaza vrši fosforilaciju receptora tipa I (82). Aktivirani receptor tipa I odašilje signal u stanicu vršeći fosforilaciju drugih glasnika, u ovom slučaju Smad molekula. Članovi obitelji koštanih morfogenetskih proteina imaju različit afinitet vezivanja na različite

kombinacije receptora tipa I i II. Koštani morfogenetski protein<sup>4</sup> veže se najvećim afinitetom za receptore ALK-3 i ALK-6, BMP7 veže se na ALK-2 i ALK-6 s mnogo većim afinitetom nego na ALK-3, a GDF5 pokazuje veći afinitet za receptor ALK-6 u odnosu na ALK-2 i ALK-3 (83). Intracelularni prijenos signala odvija se putem Smad molekula koje imaju funkciju drugih glasnika za molekule iz TGF $\beta$  nadobitelji. Heterooligomerni Smad-kompleksi odlaze u jezgru i neposredno ili u kompleksu s drugim proteinima utječu na transkripciju specifičnih gena (84). Na temelju funkcionalnih značajki Smad molekule mogu se podijeliti u tri skupine: molekule aktivirane receptorom (R-Smad) 1, 2, 3, 5 i 8; zajednički medijator ili Co-Smad 4 i inhibitorne molekule (anti-Smads)-Smad 6 i 7. Aktivacijom receptora tipa I dolazi do fosforilacije molekula iz skupine R-Smad. Koštani morfogenetski proteini fosforiliraju molekule Smad 1, 5 i 8, dok TGF $\beta$  fosforiliraju molekule Smad 2 i 3 (85). Citoplazmatski homodimeri molekula Smad skupine I nakon fosforilacije disociraju od receptora i stvaraju heterodimere s molekulama Smad 4 nakon čega se signal prenosi u jezgru. Budući da je afinitet Smad molekula za DNA malen oni ulaze u međudjelovanje s čitavim nizom koaktivatora što je uvjet za aktivaciju ciljnih gena.

Postoji i negativna regulacija aktivnosti molekula BMP-a koja je vidljiva duž čitavog BMP/Smad signalnog puta. Brojni antagonisti i pseudoreceptori inhibiraju njihovu aktivnost u ekstracelularnom prostoru od kojih su neki npr. Chordin, Noggin, Follistatin i sl. (86). Chordin se vezuje s velikim afinitetom za molekule BMP2 i -4 i sprječava njihovu interakciju s receptorima. Pokazalo se da u *Xenopusu* Frizzled srodni protein-Sizzled protein, djeluje kao inhibitor signalnog puta BMP, inhibirajući proteolizu i inaktivaciju Chordina.



Degradacija Chordina zbiva se posredovanjem BMP1/Tolloid obitelji metaloproteinaza. Protein Sizzled onemogućava cijepanje Chordina putem metaloproteinaza, tako da gubitak proteina Sizzled rezultira pojačanom degradacijom Chordina. Noggin se veže na molekule BMP-a s velikim afinitetom i blokira njihovu interakciju s receptorima, a na sličan način djeluju i članovi DAN obitelji. Folistatin sprječava vezivanje aktivina na njegove receptore i neutralizira njegovu aktivnost, a također veže i molekule BMP.

Na intracelularnoj razini djelovanje BMP može se inhibirati na nekoliko razina. Molekule Smad -6 i -7 djeluju kao inhibitorne Smad molekule, od kojih Smad-7 neselektivno inhibira prijenos signala molekula TGF $\beta$ , BMP i aktivina, dok Smad-6 selektivno inhibira BMP put. Oni to ostvaruju onemogućujući interakciju R-Smadova s transmembranskim TGF $\beta$ /BMP receptorima tipa I, aktivacijom Smurf-1 i -2 molekula čijim djelovanjem dolazi do degradacije TGF $\beta$ /BMP receptora, zatim djelujući kompetitivno na Smad-4 kao transkripcijski korepresori.

Tijekom embriogeneze koštani morfogenetski proteini djeluju kao signalne molekule u pravilnom razvoju brojnih tkiva i organa preko mezenhimalno-epitelnih interakcija (87).

Njihov je utjecaj dokazan kod razvoja muskuloskeletnog i živčanog sustava, srca, bubrega, jetre, kože, očiju i zubi (88). Koštani morfogenetski proteini djeluju na ekspresiju brojnih gena i to na neke izravno (kolagen tipa  $\alpha$ ), a na druge neizravno (osteokalcin). Ciljni geni na koje djeluju koštani morfogenetski proteini mogu se podijeliti prema strukturi i funkciji na:

1. Komponente ekstracelularnog matriksa (kolagen I $\alpha$ 1 i I $\alpha$ 2, osteokalcin, osteopontin, koštani sijeloprotein)

2. Decoy-receptore (osteoprotegrin)
3. Enzime (alkalna fosfataza)
4. Faktore rasta (CTGF i Indijski hedgehog)
5. Inhibitore BMP-a (BMP i aktivin membranski inhibitor-BAMBI, Smad-6 i -7)
6. Transkripcijske regulatore (Msx, Dlx5, Id1, Id2, Id3, JunB, Cbfa1) (89).

Njihova se uloga najbolje očituje u slučaju inaktivacije pojedinih gena, tako npr. inaktivacijom kolagenih gena (najčešće COL1A1) razvija se bolest Osteogenesis imperfecta, nedostatak osteokalcina očituje se osteoporozom, nedostatak osteopontina otežanom fibrinogenezom kolagena i usporenim cijeljenjem rana (90). Manjak alkalne fosfataze dovodi do metaboličkih i skeletalnih defekata a manjak CTGF otežava proliferaciju hondrocita, akumulaciju ekstracelularnog matriksa i angiogenezu u zonama rasta te tako dovodi do poremećaja u strukturi skeleta (91). Nedostatak hedgehog faktora otežava proliferaciju i diferencijaciju hondrocita što dovodi do smanjenog rasta. Manjak Smad6 dovodi do kardiovaskularnih malformacija (92). Potpuna inaktivacija gena za Id1-Id3 nespojiva je sa životom i dovodi do teških neuralnih i hematopoetskih poremećaja (93).

Nakon rođenja koštani morfogenetski proteini sudjeluju u homeostazi i regeneraciji adultnih tkiva. Koštani morfogenetski proteini kao pleiotropni regulatori djeluju u svim važnim koracima tkivne regeneracije: kemotaksiji stanica progenitora, mitozu, diferencijaciji i proliferaciji stanica. Molekule BMP također stimuliraju stvaranje izvanstaničnog matriksa. Upravo zbog toga postoji već duže vrijeme ideja o primjeni BMP u poticanju tkivne regeneracije unatoč nedovoljnim informacijama o svim procesima i djelovanjima samih molekula. Mnogobrojne pak studije na animalnim modelima osteoporoze,

bubrežnog zatajenja, ishemične bolesti srca, jetrenih bolesti te nekih tumora pokazuju njihovu ulogu u poticanju regeneracije tkiva (94).

Osteoinduktivna aktivnost molekula BMP2,-4,-5,-6,-7 i GDF5 dovela je nakon brojnih prekliničkih studija i do kliničke aplikacije BMP2 i BMP7 u liječenju fraktura kostiju (95). Upravo navedena preklinička istraživanja pokazala su mogućnost reparacije ozlijeđenih zglobnih hrskavica. Velike količine BMP7 pronađene su i u bubregu, mokraćnom mjehuru, nadbubrežnim žlijezdama, mozgu i kalvarijskoj kosti u odraslog miša (96).

Istraživanja na embrijima miša su pokazala su nazočnost molekule BMP7 u brojnim organima u različitoj koncentraciji ovisno o danu nakon začeća. Ekspresija glasničke RNA BMP7 molekule bila je najviša 13-og dana embrionalnog razvoja, što je u skladu s njegovom ulogom u nefrogenezi (97). Protektivna uloga BMP7 dokazan je na štakorskom modelu u razvoju lezije miokarda u uvjetima ishemije i reperfuzije (98). Preventivna primjena BMP7 smanjuje oštećenje cerebralnog korteksa izazvano ishemijskim inzultom u štakora (99). Primjena BMP7 nakon možanog infarkta dovodi do značajno bržeg i većeg oporavka kognitivnih i motornih funkcija. Proučavala se i uloga BMP u razvoju tumora. Uočeno je da se delecija Smad4 molekule u signalnom putu može naći u preko 50% karcinoma gušterače i 20% kolorektalnih karcinoma (100). Brojne molekule BMP obitelji pokazuju alteriranu ekspresiju kod raznih malignih tumora, npr. pronađena je povećana ekspresija BMP2, -4, -5, -6, Smad-2, -3, -5 i BAMBI u kolorektalnom karcinomu (101). Povećana ekspresija BAMBI molekula pronađena je i kod hepatocelularnog karcinoma (102). U slabo diferenciranom tipu karcinoma želuca bila je povećana ekspresija BMP2 i -4 što govori u prilog mogućnosti

korištenja navedenih molekula kao potencijalnih bioloških markera za navedenu bolest (103). Supresivno djelovanje BMP2 dokazano je i u staničnoj kulturi karcinoma dojke. U kožnim je pak karcinomima povećana ekspresija inhibitornog Smad-7, čija se uloga u patogenezi karcinoma tumači time da se na taj način inhibira signalni put  $TGF\beta$ , a povećava se signalni put epidermalnog faktora rasta (EGF) (104). Novija istraživanja BMP9 i BMP10 ukazuju na njihovu ključnu ulogu u signalnom putu angiogeneze. Inaktivacijom navedenih molekula u miševa eksperimentalno su se dokazale srčane malformacije nespojive sa životom kao i poremećaji u vaskularizaciji i sazrijevanju limfocita. Time se jasno pokazala njihova uloga u sazrijevanju i razvoju endotelних stanica krvi i limfnog sustava.

Na osnovi prethodno iznesenih podataka jasno je da koštani morfogenetski proteini imaju vrlo važnu ulogu tijekom embriogeneze i organogeneze, u regeneraciji i homeostazi adultnih tkiva te su uključeni u razne patofiziološke procese. Upravo u tome i počiva potencijalna mogućnost terapijske primjene čitave obitelji koštanih morfogenetskih proteina kao i svake molekule pojedinačno ili pak u raznim kombinacijama.

### 1.3.3. Koštani morfogenetski protein 1 (BMP1)

BMP1 je otkriven poput ostalih molekula koštanog morfogenetskog proteina kao sastojak pročišćenoga demineraliziranoga osteoinduktivnog ekstrakta kosti goveda. Kao i ostale molekule koštanih morfogenetskih proteina dijeli afinitet prema heparinu (105).

BMP1 ne dijeli homologiju aminokiselinske sekvence s ostalim molekulama BMP te stoga nije autentičan član TGF- $\beta$  obitelji (106). Postojanje hidrofobnog područja na aminoterminalnom kraju aminokiselinskog slijeda upućuje da se radi o sekrecijskom čimbeniku. Daljnjim istraživanjima same molekule utvrđeno je da se radi o enzimu identičnome prokolagen-C-proteinazi (PCP-1) izrazito značajnom u pravilnoj sintezi i procesiranju kolagena unutar izvanstaničnog matriksa čija je ujedno i ključna uloga u dorzo -ventralnom embrionalnom razvoju kralješnjaka (107).

Koštani morfogenetski protein-1 je sekretorna, glikolizirana cink ovisna metaloproteinaza iz astacinske obitelji metaloproteinaza (108). Astacin je probavni enzim slatkovodnog raka *Astacus astacus* čija amino kiselinska sekvenca pokazuje 35% podudarnosti sa sekvencom BMP1 (109). Sve proteinaze iz astacinske obitelji imaju N- i C-terminalnu domenu između kojih se nalazi aktivno mjesto (110). Identificirano je više od 20 članova obitelji.

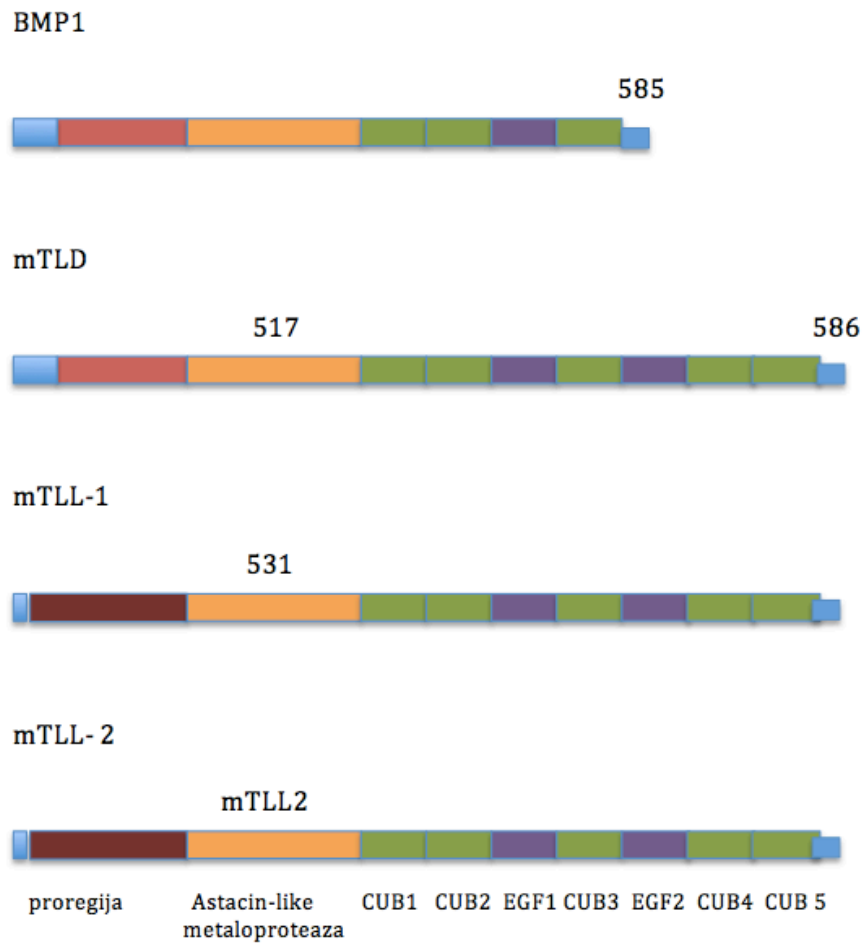
Jedinstveno obilježje astacinskih metaloproteinaza vezanje je cinka s 3 histidina, molekulom vode i tirozinom. Kod zrele molekule BMP1 na N-terminalnu prodomenu nastavlja se proteazna domena uključena u razne protein-protein interakcije. C-terminalni dio iza navedenih sadrži EGF

(epidermal growth factor) slične i CUB (complement-Uegf-BMP1) domene.

Većina poznatih članova astacinske obitelji posjeduje jednu ili više kopija epidermalnog čimbenika rasta (EGF) te domene CUB. To su nekatalitičke, interakcijske domene. EGF slične domene sastoje se od otprilike 40 aminokiselina i imaju 6 visoko konzerviranih cisteinskih ostataka. CUB domene sastoje se od 110 aminokiselinskih ostataka.

Molekule TGF $\beta$  i proteinaza BMP1 sintetiziraju se kao prekursorske molekule s terminalnim prodomenama -NH<sub>2</sub> koje se odcjepuju sa subtilizinom sličnom proprotein konvertazom. Ona u oba slučaja odcjepuje -COOH terminalni biološki aktivan oblik molekule. Svi triptički peptidi BMP 2-7 nastaju iz koštane morfogenetske frakcije koja odgovara sekvenci unutar -COOH terminalne biološki aktivne domene dalje od mjesta cijepanja proproteinske konvertaze. Nasuprot tome svi triptički peptidi BMP1 nastaju od koštano morfogenetske frakcije koštanog ekstrakta koji odgovara sekvenci unutar -NH<sub>2</sub> terminalne prodomenske regije proteina.

Nekoliko proteina s pretpostavljenom ulogom u razvoju pokazali su homologiju s molekulom BMP1 (Slika 5).



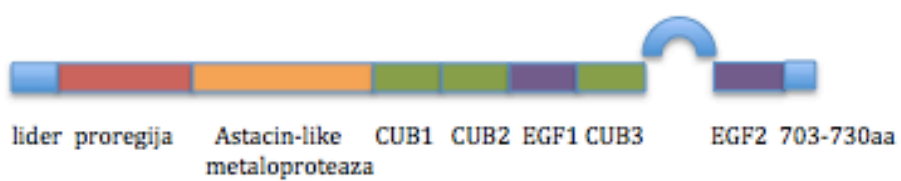
Slika 5. Izoenzimi BMP1

Tako je pronađen i *Drosophila* tolloid (TLD), produkt gena nužnog za dorzo-ventralno oblikovanje u ranoj embriogenezi *Drosophile* koji je imao sličnu strukturu domena i 41% podudarnost u aminokiselinskom slijedu s BMP1 (111). TLD se razlikuje od BMP1 u C-terminalnom kraju gdje se nalaze dva EGF područja (BMP1 ima jednu) i pet CUB domena (BMP1 ima najčešće tri).

U sisavaca postoje 4 BMP1/TLD srodne metaloproteinaze. Gen za BMP1 kodira drugu i treću proteinazu dobivenu u procesu cijepanja mRNA čija je struktura u osnovi identična BMP1 te je nazvan mammalian Tolloid (mTLD). Još dvije molekule srodnih proteinaza kodirane su različitim genima i nazvane mammalian Tolloid-like 1 i 2 (mTLL-1 i mTLL-2). Zanimljivo je napomenuti da je struktura BMP1 sačuvana nepromijenjenom tijekom milijuna godina i bila je prisutna u pretečama nematoda i kralješnjaka (112). *C. elegans* ima samo 959 stanica i 40 astacin sličnih gena koje odgovaraju strukturi BMP1 vjerojatno potrebnih za brojne funkcije uključujući digestiju hrane, pokrivanju, obradi peptida, morfogenezi i formaciji oblika. Tijekom vremena 40 gena iz *C. elegans* postupno su evoluirali u mammalian BMP1/Tolloid gene. Gen za BMP1 smješten je na 8 kromosomu i obuhvaća 26 eksona (113). Ekspresijom gena nastaje mRNA koju pak kasnije ovisno o tkivu nastanka procesuiraju različiti enzimi. Taj tkivno specifični postranskripcijski proces utječe na vrstu BMP1 izoforme koja će na kraju nastati kao rezultat genskog transkripta. Do danas je poznato 7 vrsta izoformi BMP1 proteina: BMP1 (BMP1-1), BMP1/His (BMP1-2), Tld (BMP1-3), BMP1-4, BMP1-5, BMP1-6 i BMP1-7 (Slika 6).



### BMP1



### BMP1-3



### BMP1-4



### BMP1-5



### BMP1-7



Slika 6. Izoforme BMP1 proteina

Njihova ekspresija prisutna je u različitim tkivima. Sve dijele istu N-terminalnu domenu ali se razlikuju u svojoj C-terminalnoj domeni u broju komplement Uegf-BMP1 (CUB) domena i domena epidermalnog faktora rasta (EGF) te prisutnosti različitih varijanti specifičnih domena. Razlika u broju i rasporedu CUB i EGF domena određuje specifičnost supstrata svake pojedine izoforme. Tako i dolazi do toga da pojedine izoforme više djeluju na aktivaciju članova BMP obitelji a druge npr. u cijepanju kolagena. Uloga pojedinih izoformi nije još do kraja poznata iako je uočena ekspresija pojedinih izoformi BMP1 u različitim tkivima/organima kao i u različitim njihovim patološkim stanjima (114).

BMP1/Tld - povezane metaloproteinaze djeluju na proteolitičko sazrijevanje većeg dijela izvanstaničnih proteina odgovornih za formiranje izvanstaničnog matriksa. Tijekom tkivne morfogeneze BMP1 cijepa latentne peptide izvanstaničnog matriksa uključujući tip I-III i VII prokolagena, probiglikane, leucinom bogate proteoglikane, proteine SIBLING, enzim lizil oksidaze, prolamin-5 i anti-angiogenetski faktor iz bazalne membrane - proteoglikan perlekan (115). Lizil oksidaza je enzim nužan za formiranje kovalentnih veza između fibrila kolagena i elastina, dok je laminin 5 glavna komponenta bazalne membrane kože. Kolagen tipa I, II, III glavna je fibrozna komponenta matriksa kralješnjaka te je njihovo pravilno odlaganje ključno za normalnu morfogenezu. Sintetiziraju se kao prokolagenski prekursori koji se moraju pocijepati kako bi se dobio zreli monomer sposoban za stvaranje fibrila. Uloga i važnost BMP1 molekula najbolje je vidljiva u knock-out životinja za navedeni gen. Miševi kod kojih je BMP1 gen inaktiviran rađaju se mrtvi ili umiru ubrzo nakon rođenja zbog nezatvaranja ventralnog zida i hernijacije crijeva

vjerojatno zbog poremećenog razvoja ekstracelularnog matriksa i krivog razvoja dorzoventralne strukture. Vezano za gubitak funkcije prokolagen C proteinaze navedeni miševi imaju i abnormalna kolagenska vlakna (116). Izoenzimi BMP molekula također pokazuju značajnu ulogu. U miševa ekspresija mTLL-1 limitirana je na kardiovaskularni sustav do 10 dana nakon začeća i u ranoj fazi sudjeluje sa srčano specifičnim transkripcijskim faktorom Nkx-2.5 koji vjerojatno sudjeluje u vođenju mTLL-1 ekspresije u tom tkivu (117). Nakon desetog dana od začeća mTLL-1 izražava puno širu ekspresiju, ali miševi s inaktivnim mTLL-1 umiru otprilike oko 13.5 dana nakon začeća vjerojatno od deficita ograničenog na kardiovaskularni sustav. U ljudi su uočeni različiti polimorfizmi u kodiranim sekvencama mTLL-1 gena i to kod bolesnika s atrijalnim septalnim defektom time ukazujući na njihovu ulogu u sraštanju i formiranju srca (118).

Unatoč brojnim istraživanjima molekule BMP1, i dalje postoje nepoznanice u njegovoj aktivaciji i mjestu cijepanja supstrata. BMP1 sintetizira se kao inaktivni proenzim i mjesto odcjepljivanja prodomene se definira kao mjesto aktivacije BMP1. Aktivna proteaza uspjela se izolirati iz medija stanične kulture humanih stanica i tetiva organskih kultura. Pretpostavlja se da prodomena sudjeluje u održavanju BMP1/Tld sličnih proteaza u latentnoj formi. Ekspresija rekombinantnog BMP1 proteina bez prodomene pokazuje da njezin nedostatak ne ometa sekreciju ali i ne izbacuje ulogu prodomene u sekreciji molekule BMP1 i regulaciji mjesta njegove aktivnosti (119). Prodomena vjerojatno održava BMP1 u inaktivnoj formi do mjesta svoje aktivacije gdje se onda njezinim odcjepljivanjem oslobađa aktivni oblik molekule BMP1. Odcjepljivanje prodomene od molekule BMP1 stoga je

ključna za njegovu aktivnost. BMP1 slične proteinaze uključene su u aktivaciju nekih od članova nadobitelji TGF $\beta$  koji uključuju faktore rasta i diferencijacije (GDFs) 8 i 11, TGF $\beta$ -1 i BMP2 i -4 djelujući na izvanstanične antagoniste. BMP2 i -4 aktiviraju se cijepanjem izvanstaničnog antagonista Chordina putem BMP1 proteinaze (120).

U funkciji i ulozi pojedinih izomorfi BMP1 proteina pokazala se ključna razlika u C-terminalnom kraju molekule. Kod izoforme BMP1-2 zadnja domena na C-terminalnom kraju molekule zamijenjena je s dugom histidin bogatom domenom te se još naziva i BMP1/His. Izoforma BMP1-4 razlikuje se od ostalih po tome što je proteazna domena prekinuta s dodatnim egzonom. Pretpostavlja se da takav oblik može vezati ciljnu molekulu, ali ju nemože i cijepati. Prema tome, uloga takve molekule bila bi inhibitor enzimske funkcije. U ostalim izoformama BMP1 proteolitička domena je netaknuta a modifikacije obuhvaćaju C-terminalnu regiju odgovornu za protein-protein interakciju. Hipoteza da svaka od navedenih izoformi molekule BMP1 djeluje kao samostalna proteaza sa svojom jedinstvenom funkcijom temelji se na njihovim različitim ekspresijskim izražajima. BMP1-5 pokazuje ekspresiju 20% u placenti te 50% u bubregu. BMP1-4 1% u placenti te 9% u ovariju (114). Jedinstvena struktura gena BMP1, njegova smanjena količina ekspresije, uloga u morfogenezi i njegova filogenetska očuvanost čini taj enzim izglednim kandidatom u regulaciji tkivne morfogeneze.

Zrela molekula BMP1-3 od osnovne se molekule razlikuje u dvjema dodatnim CUB domenama ( CUB 4 i 5). Razlika u građi je vjerojatno vezana za organospecifično i tkivnospecifično djelovanje pojedinih molekula. Tako je molekula BMP1-3 dokazana u plazmi bolesnika od pojedinih bolesti u većoj

razini u odnosu na zdrave pojedince. Spomenute bolesti uključuju kronično bubrežno zatajenje kao i akutni koštani prijelom. Dokazano je da uslijed koštanog prijeloma dolazi do povećanja cirkulirajućeg BMP1-3 u sklopu sistemskog odgovora i njegove aktivacije, kao i ostalih BMP1 izoformi, u sintezi izvanstaničnog matriksa (121). Tako je *in vivo* na štakorskom modelu prikazan utjecaj povećanja količine BMP1-3 na uspješno cijeljenje kosti dok je primjena specifičnih protutijela na BMP1-3 prolongirala vrijeme koštanog oporavka. U zečjem modelu prijeloma ulne lokalnom primjenom BMP1-3 dokazalo se ubrzano cijeljenje i pregradnja kosti. Uloga BMP1-3 se pokazala ključnom u diferencijaciji osteoblasta te koštanoj formaciji (121). Za uredno cijeljenje kosti potrebna je normalna međusobna interakcija između faktora rasta, proteinaza uključenih u sintezu kolagena te koštanih stanica. Svako narušavanje ravnoteže u odnosu navedenih čimbenika pridonosi otežanom ili nedovoljnom cijeljenju i remodeliranju koštanog matriksa.

Dodatna istraživanja koja pokazuju ulogu BMP1-3 molekule provedena su na štakorskom modelu kronične bubrežne bolesti. Dokazala su da BMP1-3 molekula postoji u cirkulirajućem obliku u plazmi te da je povišena u bolesnih životinja kod kojih je eksperimentalno izazvano oštećenje bubrežnog parenhima. Primjena BMP1-3 specifičnih protutijela smanjila je nastanak fibroze u bubrezima te spriječila pogoršanje bolesti. Životinje kod kojih nije primijenjena terapija protutijelima protiv spomenute izoforme BMP su razvile značajnu renalnu fibrozu uz posljedičan potpuni gubitak renalne funkcije te smrt životinja (122). Navedeno istraživanje potvrdilo je također da aktivni dio molekule BMP1-3 ne sadrži prodomenu. Odvajanje iste je potrebno kako bi BMP1-3 molekula iz latentne faze prešla u aktivnu. Nadalje, pokazalo se da

dodavanjem BMP1-3 molekule u nekoliko različitih omjera u cirkulaciju susljedno tome pogoršava fibrozu i ishod bolesti. Podatci govore u prilog tome da je cirkulirajući oblik BMP1-3 molekule bitan čimbenik u regulaciji i sintezi izvanstaničnog matriksa što dovodi posljedično do razvoja fibroze kao temelja niza bolesti.

#### **1.4. Remodeliranje miokarda nakon infarkta, izvanstanični matriks i fibroza**

Remodeliranje lijevog ventrikula nakon infarkta značajno pridonosi njegovoj dilataciji, zatajenju i kasnije smrti. Ukoliko je smrt nastupila naglo miokard je obično normalna izgleda. Prve makroskopske promjene vide se tek nakon 24 sata od nastanka okluzije koronarne arterije. Tijekom drugog dana područje infarkta djeluje bljeđe od okolnog miokarda. Tri do pet dana kasnije područje infarkta djeluje žućkasto ili pjegasto pri čemu se vide zone svjetlijeg miokarda. Potkraj prvog tjedna infarkt je obično sivožućkaste boje, mekši od okolnog miokarda te djeluje uleknuto. Tijekom drugog tjedna infarkt djeluje pjegasto, sadrži crvene zone pojačane prokrvljenosti i siva područja fibroze. Koncem trećeg tjedna infarkt postaje homogeno crvenkastosiv i sve više sliči rani u cijeljenju. Poslije šest tjedana područje zacijeljenog infarkta je sive boje i nalikuje na vezivni ožiljak (123).

Mikroskopski promjene u području infarkta slične promjenama koje se vide tijekom cijeljenja rane. Nakon prvotnog oštećenja nekrotično tkivo infiltriraju neutrofilni leukociti koje ubrzo zamijene makrofagi. Makrofagi luče citokine i čimbenike rasta koji stimuliraju urastanje angioblasta i fibroblasta i stvaranje granulacijskog tkiva. S vremenom se granulacijsko tkivo pretvori u vezivni ožiljak. Tijekom prvog dana promjene su suptilne i infarkt se teško može patohistološki verificirati. Miokardijalne stanice se intenzivnije boje eozinom a karakteristične poprečne pruge su slabo vidljive ili su u potpunosti nestale. Tijekom drugog dana nekroza srčanih miocita i kapilara je jasnije vidljiva a popraćena je infiltracijom neutrofilnih leukocita. Miociti su zrnate ili svijetle citoplazme a jezgre im se raspadaju. Cijelo je područje edematozno a krv

izlazi iz nekrotičnih kapilara i prožima područje infarkta. Tijekom trećeg dana miociti se počinju raspadati a neki od leukocita počinju odumirati što se mikroskopski vidi kao piknoza i karioreksa njihovih jezgara. Od četvrtog do šestog dana neutrofilni se leukociti postupno nadomještaju makrofagima. Potkraj prvog tjedna u područje nekroze počinju urastati fibroblasti i angioblasti i cijelo se područje postupno pretvori u granulacijsko tkivo. Tijekom drugog tjedna granulacijsko tkivo nadomješta oštećeni dio miokarda pri čemu makrofagi fagocitiraju fragmentirana miokardijalna vlakna a angioblasti tvore brojne krvne žile. Od drugog do četvrtog tjedna u granulacijskom tkivu dolazi do sve jačeg odlaganja kolagena. Od četvrtog do šestog tjedna krvne žile i makrofagi se povlače a fibroblasti proizvode sve više međustanične tvari tako da se krajem šestog tjedna infarkt pretvori u vezivni ožiljak. (Tablica 2.)

*Tablica 2: Faze cijeljenja i remodeliranja poslije IM*

Stadiji/Vrijeme	Patofiziološki proces
Vrlo rano (≈prva 24 sata)	Akutni razvoj i završetak IM; edem, ↑ glikozaminoglikana; nekroza, apoptoza; akutna upala, neutrofilno predominantna; aktivacija citokina, ↑ MMP-a; pojačana degradacija ECCM-a
Rano (≈unutar 2 tjedna)	Rano cijeljenje IM, prije postizanja platoa kolagena; kronična upala s najvećom vrijednosti makrofaga nakon ≈48 sati, mononuklearne stanice; predominacija fibroblasta nakon ≈1 tjedan; ↑ Miofibroblasta; povećana P4H aktivnost nakon ≈5 dana, ↑TGFβ, CTGF; odlaganje kolagena u IZ, peterostruko ili više
Kasno (≈3-6 tjedana)	Kasno cijeljenje I do formiranje ožiljka nakon platoa kolagena; malo stanične infiltracije; Miofibroblasti
Vrlo kasno (≈1.5 mjeseci do 1 godina ili više)	Kasno cijeljenje IZ i fibroza NIZ, s kontinuiranim remodeliranjem ECCM-a; Miofibroblasti



Gotovo 75% stanica u zdravom srcu čine nemiociti . Od njih su najbrojniji fibroblasti koji pak čine 90 -95% stanične mase nemiocita (124). Stanice miokarda su podržane matriksom koji je građen od makromolekulske mreže vlakana u pravilnoj trodimenzionalnoj organizaciji koja uveliko određuje strukturu i funkciju srca (125). Fibroblasti i miofibroblasti proizvode većinu makromolekula matriksa uključujući kolagen – glavni strukturalni protein. 85% ukupnog kolagena je tip I karakterističan po debljim nitima. One pojačavaju snagu i pružaju otpor rastezanju i deformaciji dok oko 11% ostalog kolagena jest tip III koji je karakterističan po tanjim nitima koje pridonose elastičnosti. Sinteza kolagena je složeni enzimatski proces koji uključuje brojne čimbenike (126).

Ekstracelularni kolagenski matriks (ECCM) je kompleks nekoliko proteina koji umreženi okružuju stanice i čine značajan udio svakog tkiva te umnogome određuju njegovu konzistenciju. ECCM regulira proliferaciju, kretanje i diferencijaciju stanica koje žive u njemu, sadrži susprate koji omogućuju staničnu adheziju i migraciju te služi kao rezervoar faktora rasta. ECCM je u stalnoj mijeni, osobito tijekom morfogeneze, cijeljenja, kronične fibroze, tumorske invazije ili metastaziranja. Sintetiziraju ga mezenhimalne stanice (npr. fibroblasti) i obično je u obliku već spomenutoga amorfno trodimenzionalnog gela. Sastoji se od fibrilarnog i nefibrilarnog kolagena.

Tri su osnovne komponente ECCM: 1) vlaknasto strukturirani proteini kao kolagen i elastin koji osiguravaju snagu i elastični odgovor tkiva, 2) vodeno hidratantni gel: proteoglikani i hijaluronani koji daju konzistenciju i djeluju kao lubrikatori i 3) adhezivni glikoproteini koji povezuju elemente matriksa s drugim stanicama.

Kolagen tvore tri odvojena polipeptidna lanca formirana u trostruku uzvojnici: postoji 30-tak vrsta od kojih su neki karakteristični za određenu vrstu stanica ili tkiva. Vlaknasti kolagen čini glavninu vezivnog tkiva tijekom cijeljenja te u ožiljku (tip I i III). Elastin grade elastična vlakna zaslužna za vraćanje u početnu strukturu. Građen je od centralne srži oko koje se nalazi mreža vlaknastih glikoproteina. Proteoglikani i hijaluronani osiguravaju lubrikaciju i elastičnost. Sastoje se od dugih mukopolisaharida, glikozaminoglikana i mukopolisaharida. Adhezivni glikoproteini su strukturalno različite molekule koje sudjeluju u međustaničnim vezama, povezuju stanice s ekstracelularnim matriksom te povezuju komponente ekstracelularnog matriksa (127).

Ekstracelularni kolagenski matriks je stoga puno više od specifičnog ispuna između stanica. Funkcije su mu različite i uključuju: mehaničku potporu za organizaciju stanica, njihovu pokretljivost i održavanje polarnosti. Nadalje ECCM kontrolira staničnu proliferaciju vezanjem faktora rasta i njihovom signalizacijom. Nadalje ima veliki potencijal za obnovu tkiva gdje regeneracija ovisi o očuvanosti integriteta ECCM. Ukoliko je on oštećen regeneracija nije moguća i cijeljenje će biti moguće samo stvaranjem ožiljka. Ako nisu zadovoljeni uvjeti za regeneraciju, događa se ili cijeljenje ožiljkom ili kombinacija regeneracije malog broja stanica uz dominantnu reparaciju i fibrozu. Fibroza je postupni proces koji započinje tijekom ranih faza upale, a uključuje: angiogenezu (formiranje novih krvnih žila), migraciju i proliferaciju fibroblasta i odlaganje vezivnog tkiva uz upalni infiltrat (granulacijsko tkivo) te sazrijevanje i reorganizaciju vezivnog tkiva (remodeliranje) i stvaranje vezivnog ožiljka. (Tablica 3.)

**Tablica 3. Glavne sastavnice ECCM i njihova uloga**

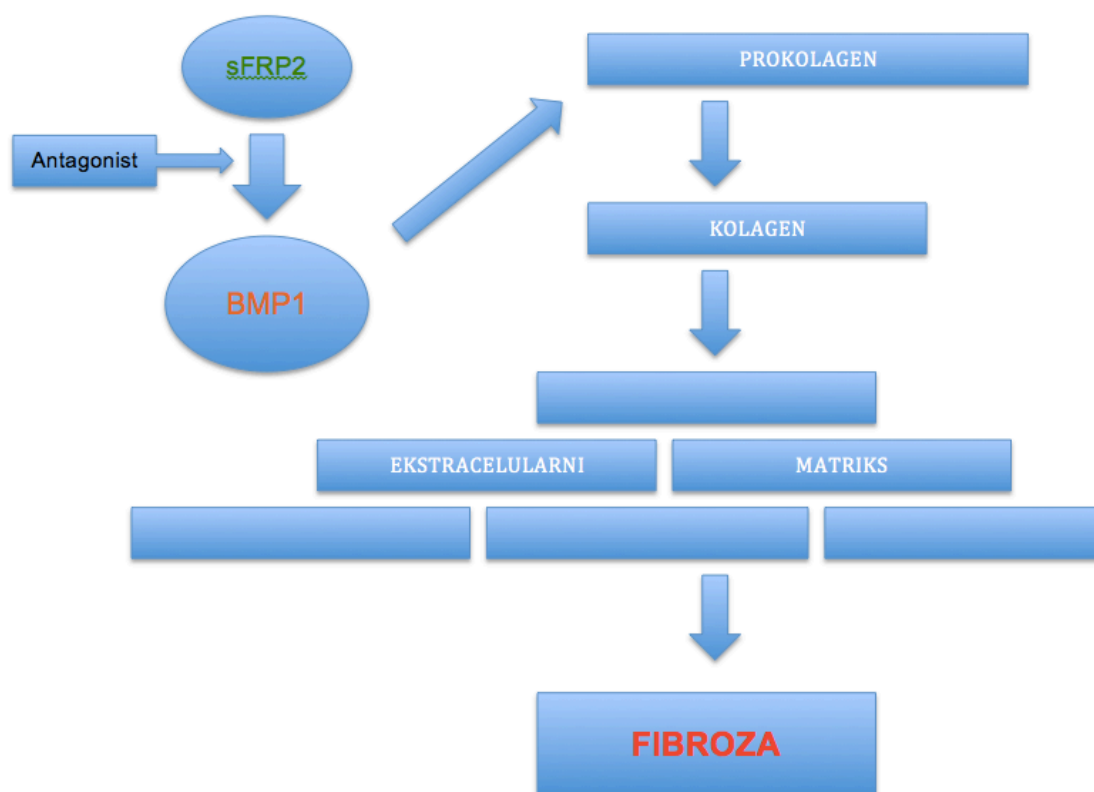
Komponenta	Funkcija
Fibrili Kolagena (tipovi I ili III)	Strukturalna potpora, zadržati oblik  Prijenos sile  Tenzilna snaga (tip I), otpornost (tip III)
Elastin	Otpornost, rastezljivost stijenke krvne žile rastezljivost i relaksacija srčane stijenke
Stanice	
Fibroblasti	Stvaraju fibrile kolagena konverzija u miofibroblaste nakon ozljede
Makrofazi	Fagocitoza; upalni odgovor; monociti
Plazma stanice	Imunološki odgovor
Ostale stanice	Endotelne stanice, glatke mišićne stanice, periciti, neuroni
Želatinozni matriks (osnovna supstanca)	Viskozna tekućina nalik gelu, oplahuje stanicu i fibrile
Hidrofilini glikozaminoglikan	Difuznija hranjivih tvari, metabolita, faktora rasta, citokina, lijekove itd.
Glikoproteini	Prehrana miocita, lubrikacija
Integrini (receptori matriksa)	Interakcija miociti - fibroblasti; remodelacija matriksa
Fibronektini i laminini	Prvenstveno nekolageni ahezivni fibrozni proteini

Angiogeneza je proces stvaranja novih krvnih žila iz postojećih. Ona je kritični proces u cijeljenju i omogućuje stvaranje kolaterala koje štite od ishemijskih oštećenja. Obuhvaća niz čimbenika rasta, međusobnu staničnu interakciju te interakciju stanica s ECCM i tkivnim enzimima kao i kontrolne mehanizme povratne sprege. Od svih induktora angiogeneze najvažnija je hipoksija a slijede je PDGF, TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ . Proteini ECCM sudjeluju u navedenom procesu preko receptora na endotelnim stanicama. Matriks metaloproteinaze (MMP) omogućuju degradiranje ECCM i formiranje vaskularnih cijevi (128).

Novija istraživanja ukazuju da je upravo remodeliranje ECCM, njegova sinteza i razgradnja, ključan proces u remodeliranju miokarda, najviše lijevog ventrikula, poslije infarkta miokarda (129). Dokazano je da poremećaj u sintezi ECCM pojačava fibrozu lijevog ventrikula (LV) dovodeći tako do njegove dilatacije te kasnije rupture (130). Povezano s nakupljanjem ECCM dolazi do poremećaja i dijasoličke funkcije te nastajanja kronične kardiomiopatije. Razlike u samoj infarciranoj zoni i neinfarciranoj zoni ovisne su o veličini samog infarkta te susljedno tome i jačini upalnog odgovora. Ključnom molekulom čitavog ciklusa fibroze svakako se pokazala matriks metaloproteinaza (MMP) kao i tkivni inhibitori matriks metaloproteinaze (TIMMP) (131). Fibroblasti i njihova aktivacija u upalnom odgovoru na ishemijski događaj glavni su rezervoar navedenih enzima. Pravilna ravnoteža između MMP koje razgrađuju ECCM i endogenih TIMMP koji isti taj proces zaustavljaju održavaju proces remodeliranja urednim. Svaka neravnoteža navedenih čimbenika dovodi do poremećaja. MMP kao važne kolagenaze su visoko specifične i primarno cijepaju kolagen na određenim mjestima time razgrađujući strukturalnu cjelovitost minimalnom količinom proteolize. Jednom kada se MMP vežu za vlakna kolagena i počnu s djelovanjem mogu tako nastaviti dok čitav kolagen nije razgrađen osim ako nisu zaustavljene TIMMP čime se aktivira ujedno glavni inhibitorni mehanizam nekontroliranje razgradnje (132). Njihova genska ekspresija kontrolirana je na transkripcijskoj razini (133). Fibrotski efekt molekula TGF $\beta$  obitelji nije stoga prouzročen pretjeranim nakupljanjem ECCM već narušenim odnosom MMP/TIMMP. BMP1 također predstavlja jednu od ključnih molekula u funkciji metaloproteinaza u nastanku fibroze. Njezina jasna uloga u procesu fibroze i

utjecaj antagonista na smanjenje iste detaljnije je opisana u prethodnom poglavlju. S obzirom na to da se upalni odgovor kao reakciju tkiva na ishemijski događaj ne može znatnije utjecati otvorila se mogućnost da se djelovanjem na razne molekule u kaskadnom slijedu događaja i stanične modulatore u navedenom procesu zaustavi daljnja fibroza te tako smanji funkcionalno oštećenje srca. Upravo tu leže temelji uspješne antifibrotičke terapije.

Nedavno je na animalnom modelu AIM testiran učinak secreted frizzled related protein 2 (sFRP2) na fibrozu u procesu cijeljenja (134). sFRP2 ima sposobnost modulacije pregradnje ECCM djelujući pozitivno na metaloproteinaze, tj. BMP1 koje cijepaju prokolagen u zrela kolagena vlakna. Autori su pokazali da miševi s homozigotnim nul alelom za sFRP2 stvaraju manje ožiljkastog tkiva nakon AIM te imaju očuvanu srčanu funkciju. Stoga predlažu korištenje antagonista sFRP2 za kontrolu stvaranja fibrotičnog tkiva u srcu za vrijeme cijeljenja nakon AIM (Slika 7).



Slika 7. Shema djelovanja antifibrotičnog agensa

Nakon ovog otkrića objavljeni su kontradiktorni podatci koji pokazuju da sFRP2 u visokoj koncentraciji inhibira *in vitro* procesiranje prokolagena pomoću BMP1 (135). U životinjskom modelu AIM nakon primjene sFRP2 dokazano je smanjeno odlaganje kolagenih vlakana. Ehokardiografska analiza nakon 4 tjedna potvrdila je povoljan učinak sFRP2 na sprječavanje stanjenja prednje srčane stijenke i posljedično poboljšanu ejekcijsku frakciju. Zbog suprotnih rezultata ovih dvaju istraživanja ostaje nerazjašnjena uloga sFRP2 u cijeljenju nakon AIM. No oba rada imaju cilj modulacijom sFRP2 smanjiti razinu BMP1, što jednoznačno potvrđuje njegovo djelovanje na fibrotični put.

## 2. HIPOTEZA

Fibrogeneza je vodeći patofiziološki proces u čitavom nizu bolesti koje kao posljedicu imaju kroničan tijek ili smrtni ishod.

Proces fibrogeneze odvija se usporednim stvaranjem izvanstaničnog matriksa i njegovom razgradnjom putem metaloproteinaza. Koštani morfogenetski protein BMP1-3 predstavlja središnju molekulu u tom procesu i njegova neutralizacija specifičnim protutijelima stoga bi reducirala formiranje ožiljkastog tkiva u srčanom mišiću. Smanjeno nakupljanje fibroznog tkiva imalo bi pozitivan terapijski učinak na kasnije preživljenje životinja i srčanu funkciju kao i korekciju biokemijskih i histoloških pokazatelja infarkta.

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

1) Analizirati laboratorijske vrijednosti enzima specifičnih za miokard u krvi kao i tkivno-patohistološke promjene miokarda u eksperimentalno izazvanom infarktu miokarda kod štakora.

2) Istražiti utjecaj primjene protutijela na molekulu koštanog morfogenetskog proteina BMP1-3 kao ključne molekule u procesu fibroze. Pratiti razvoj fibroze kao posljedice infarkta miokarda te njezino moguće smanjenje ili zaustavljanje.

3) Procijeniti ulogu koštanog morfogenetskog proteina BMP1-3 i specifičnog protutijela u produljenom preživljavanju životinja nakon eksperimentalno izazvanog infarkta miokarda kao i kasnije funkcioniranje srčanog mišića procijenom UZV funkcije miokarda i laboratorijskih vrijednosti enzima.



## **4. MATERIJALI I METODE**

### **4.1. Štakorski model infarkta miokarda**

Koristio se lijevi parasternalni rez za pristup na prsni koš životinje u razini četvrtog i petog međurebrenog prostora. Kroz četvrti međurebreni prostor pristupilo se na srce, identificirala se lijeva anteriorna silazna arterija (LAD) koja se podvezala 6-0 kirurškim šavom otprilike 3 mm od njezina izlazišta. Uspješnost ligacije provjerila se vizualnim pregledom lijeve klijetke. Prsni koš, veliki prsni mišić i koža zatvarali su se po slojevima šavima debljine 2-0.

Kao anestezija tijekom operacije koristila se Rompun (Xylapan 0,6 ml/kg i.p.) i Ketamin (Narketan 0,8 ml/kg i.p.). Tijekom anestezije i postoperativno životinje su se držale na toplom, kako ne bi razvile hipotermiju.

### **4.2. Pokusne životinje**

U pokusu su se koristili štakori stari 3 do 6 mjeseci. Roditeljski parovi štakora uvezeni su 2. srpnja 2007. iz Italije („Harlan“) za potrebe daljnjeg vlastitog uzgoja pod kontroliranim zdravstvenim nadzorom u prostorima nastambe za laboratorijske životinje Laboratorija za mineralizirana tkiva. Koristili su se spolno zreli mužjaci tjelesne mase od 330 do 350 grama i spolno zrele ženke od 240 do 260 grama. Spolovi su u pokusima bili jednakomjerno zastupljeni.

#### 4.3. Uvjeti smještaja laboratorijskih životinja tijekom pokusa

Mikroklimatski parametri u nastambi: temperatura 20-24°C, relativna vlaga zraka u prostorijama 40-70%, ciklusi svjetla i tame 12/12 sati i razina buke do 60 Db. Sve su životinje bile pod veterinarsko zdravstvenim nadzorom s dnevno vođenom evidencijom mikroklimatskih parametara. Kontrola hrane, stelje i laboratorijske opreme primjerena je vrsti životinja na kojima je proveden pokus, renomiranih proizvođača.

Laboratorijske životinje inače se smještaju, uzgajaju i o njima se vodi odgovarajuća skrb u registriranom i odobrenom objektu Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Šalata 3, pod identifikacijskim brojem **HR-POK-001**.

Eksperimenti su se izvodili pod nadzorom odgovorne osobe doktora veterinarske medicine, voditelja pokusa koji je planirao i izradio protokol pokusa te osposobljenog i educiranog tehničkog osoblja koje radi u nastambi za laboratorijske životinje. Kako su bili stvoreni svi preduvjeti za minimalnu bol i patnju tijekom provođenja pokusa, laboratorijske životinje nisu trpjele jaku niti dugotrajnu bol.

#### **4.4. Proizvodnja i primjena monoklonskih protutijela**

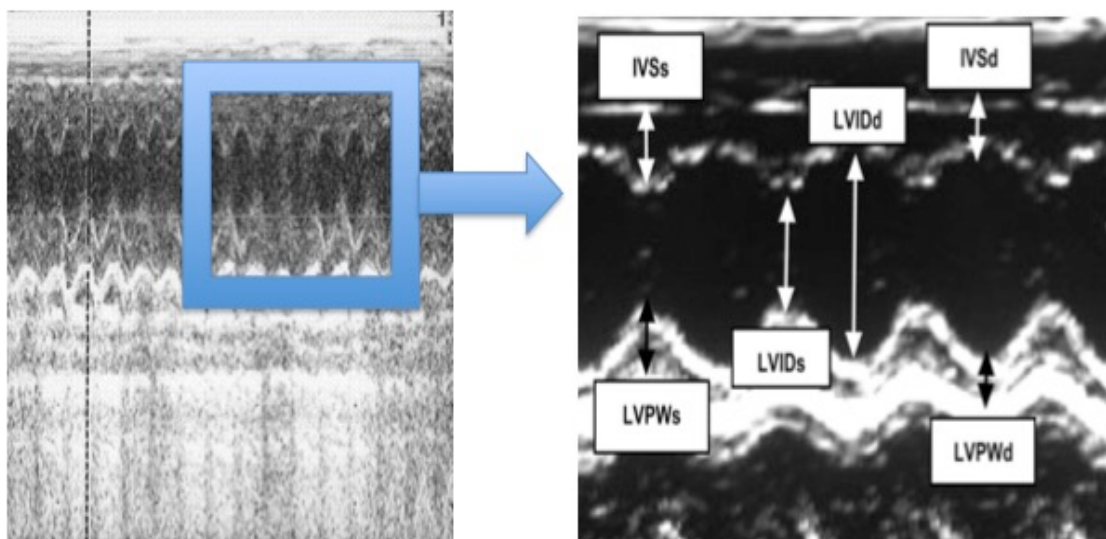
Korišteno je monoklonsko BMP1-3 protutijelo dobiveno tehnikom koju su opisali 1975. Kohler i Milstein. Opisana je tehnika dobivanja stanica koje su hibridi B-limfocita i mijelomskih stanica, a koje su sposobne kontinuirano proizvoditi odabrano protutijelo. Učinkovitost monoklonskih protutijela testirali smo sukladno hipotezi i tako stvorili preduvjete za daljnji razvoj tih protutijela kao novih antifibrotičnih lijekova.

#### **4.5. Mjerenje plazmatske koncentracije specifičnih srčanih enzima**

Nekroza i oštećenje stanica miokarda pratila se mjerenjem razine specifičnih enzima u plazmi: troponina-t ( $\mu\text{g/ml}$ ), srčano specifične kreatinin kinaze (CK-MB) ( $\mu\text{g/ml}$ ) te laktatične dehidrogenaze (LDH) (U/L). Uzorci krvi uzimali su se iz repne vene životinje, prikupljajući krv u hepariniziranim epruvetama te centrifugirani 15 minuta na 2000g. Za određivanje koncentracije enzima koristili su se komercijalno dostupni kitovi (Sigma-Aldrich). U obzir su uzete poznate vrijednosti serumskih raspona pojedinih enzima.

#### 4.6. Ehokardiografska evaluacija srčane funkcije

Prije započete ehokardiografske analize životinje su bile blago anestetizirane ketaminom i rompunom. Učinjen je transtorakalni ultrazvuk sektorskom sondom koristeći aparat Aloka-Hitachi, Švicarska, pri čemu se služilo analizama u M-modu i B-modu. U M-modu analizirali su se sljedeći parametri: unutrašnje dimenzije lijevog ventrikula u sistoli i dijastoli (LVIDs i LVIDd), debljina intraventrikulskog septuma u sistoli i dijastoli (IVSs i IVSd), debljina stražnje stijenke lijeve klijetke u sistoli i dijastoli (LVPWs i LVPWd). Iz ovih mjerenja određena je ejekcijska frakcija (EF), frakcija skraćivanja (FS), udarni volumen (SV) te volumen na kraju sistole i dijastole (EDV i ESV) (Slika 8). Svi navedeni parametri standardni su pokazatelj urednog rada srca kao i njegovog odstupanja bez obzira na etiologiju.



*Slika 8: prikaz mjerenih srčanih UZV parametara*

#### **4.7. Patohistološka evaluacija miokarda**

Nakon žrtvovanja štakorska su se srca fiksirala u 4% paraformaldehidu tijekom 24 sata te su potom uklapana u parafinske blokove. Prema protokolu parafinski su blokovi rezani na debljinu od 6 $\mu$ m. Rezovi su bojani hemalaun-eozin bojenjem kako bi se utvrdila točna morfologija tkiva i dodatno sirius red bojenjem koje specifično boji kolagena vlakna. Na taj način pratila se dinamika ožiljka u različitim vremenskim razdobljima tijekom prvih mjesec dana, točnije nakon 7 i 30 dana, kada se smatra da se najintenzivnije remodelira miokarda i stvara ožiljak. Analizu smo koristili samo kao potvrdu infarkta miokarda bez dodatne histomorfometrijske usporedbe uzoraka.

#### **4.8. Statistička analiza**

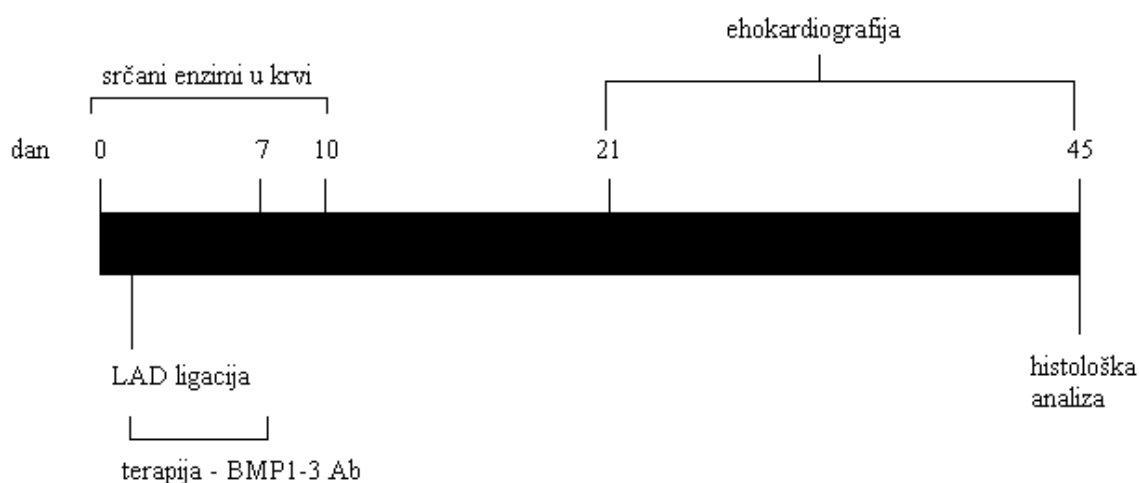
Svi podatci prezentirani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Utjecaj terapije specifičnim protutijelima protiv izoforme BMP 1-3 na vremensku dinamiku enzima odredila se analizom varijance za ponovljena mjerenja, a na srčani mišić odredila se pomoću analize varijance (ANOVA) s posljedičnim Dunnet-ovim t-testom. Rezultati se smatraju statistički značajnim kada je vjerojatnost pogreške (P) bila manja od 0,05.

#### 4.9. Prikaz redoslijeda istraživanja

Ovim pokusom pratio se terapijski učinak monoklonskog protutijela protiv BMP1-3 u štakorskom modelu infarkta miokarda . Životinje su podijeljene u 3 grupe, po 10 životinja u svakoj:

- 1) sham (operirane životinje bez izazvanog AIM koje ne primaju terapiju)
- 2) AIM (izazvan AIM, bez terapije)
- 3) BMP1-3Ab (izazvan AIM, terapija s BMP1-3 protutijelom)

Kao što je prethodno opisano štakorima se podvezivanjem koronarne arterije izazvao AIM. Skupina tretirana s BMP1-3 Ab počela je isti dan primati protutijela u dozi 15 µg/kg koja se u prethodnim istraživanjima pokazala najučinkovitijom. Ostale skupine nisu primale nikakvu terapiju. Krv se svim životinjama vadila tijekom prvih deset dana pokusa te jedan dan preoperativno. Iz uzorka krvi određivala se vrijednost srčanih enzima. Ehokardiografska mjerenja rađena su 21. i 45. dan. Štakori su žrtvovani 45. dan te je učinjena patohistološka analiza prema ranije opisanom protokolu.



## 5. REZULTATI

### 5.1 Promjena vrijednosti srčanih enzima i ultrazvučnih parametara u životinja nakon eksperimentalno izazvanog akutnog infarkta miokarda

U Tablici 4. te na Grafikonu 1. prikazane su plazmatske koncentracije CK-MB u životinja s eksperimentalno izazvanim IM-om te u onih u kojih je provedena sham procedura u više vremenskih točaka tijekom 10 dana nakon zahvata. Iz iste tablice i grafikona vidljivo je da postoji značajno ( $>3x$ ) povećanje prosječne plazmatske koncentracije CK-MB u životinja s AIM (sa  $204.7 \pm 56.5$  nakon 24h na  $623.8 \pm 190.3$  petog dana) uz značajan pad vrijednosti (1/2 maksimuma) desetog dana ( $318.3 \pm 197.7$ ) nakon provedenog zahvata. Iz Tablice 4. te Grafikona 1. također je vidljivo da vremenska dinamika plazmatske koncentracije CK-MB u životinja sa sham za hvatom pokazuje značajno manji otklon vrijednosti od početnih uz blago povećanje 5. i 7. dana nakon zahvata (s  $258.2 \pm 37.7$  na  $338.2 \pm 205.2$ , odnosno  $289.2 \pm 133.1$ ). Koncentracije CK-MB izmjerene 2., 5. i 7. dana nakon zahvata u AIM životinja statistički su značajno bile više ( $P=0.011$ ,  $P=0.044$ ,  $P=0.023$ , susljedno) od koncentracija CK-MB izmjerenih na iste dane u sham.

U Tablici 5. prikazane su vrijednosti srčanih parametara mjerenih UZV-om (unutrašnje dimenzije lijevog ventrikula u sistoli i dijastoli (LVIDs i LVIDd), debljina intraventrikulskog septuma u sistoli i dijastoli (IVSs i IVSd), debljina stražnje stijenke lijeve klijetke u sistoli i dijastoli (LVPWs i LVPWd) te ejeckijska frakcija (EF) i frakcija skraćenja (FS) u životinja s eksperimentalno izazvanim AIM-om te onih iz sham skupine. Iz Tablice 5. je vidljivo da su

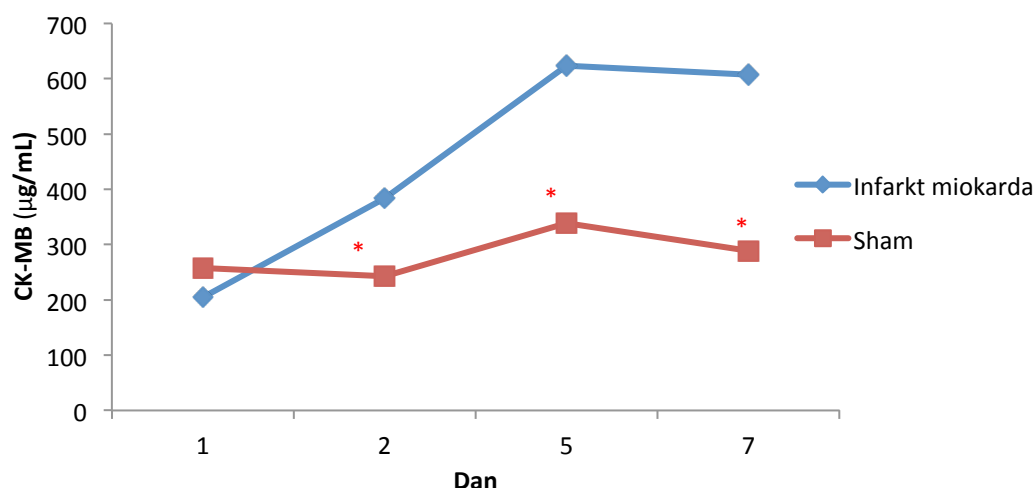
izmjerene usporedive dimenzije IVSd (sham prema AIM;  $1.300 \pm 0.256$  mm prema  $1.313 \pm 0.227$  mm,  $P=0.873$ ), LVIDd (sham prema AIM;  $5.328 \pm 0.0995$  mm prema  $5.883 \pm 1.146$  mm,  $P=0.139$ ), LVPWd (sham prema AIM;  $1.737 \pm 0.441$  mm prema  $1.837 \pm 0.343$  mm,  $P=0.456$ ) i IVSs (sham prema AIM;  $2.325 \pm 0.329$  mm prema  $2.136 \pm 0.604$  mm,  $P=0.274$ ) među skupinama te veće dimenzije LVIDs (sham prema AIM;  $2.771 \pm 0.751$  mm prema  $3.454 \pm 0.832$  mm,  $P=0.016$ ; Grafikon 2.) i LVPWs (sham prema AIM;  $2.732 \pm 0.509$  mm prema  $3.543 \pm 1.738$  mm,  $P=0.084$ ) u AIM skupini te statistički značajno manja EF (sham prema AIM;  $84.506 \pm 5.476$  % prema  $77.282 \pm 7.170$  %,  $P=0.002$ ; Grafikon 3.) i FS (sham prema AIM;  $48.521 \pm 5.769$  % prema  $41.404 \pm 6.993$  %,  $P=0.003$ ; Grafikon 4.) u AIM skupini.



Tablica 4. Usporedba plazmatskih koncentracija CK-MB u životinja s eksperimentalno izazvanim AIM-om te sham skupine u više vremenskih točaka tijekom 7 dana nakon zahvata

AIM Dani	1	2	5	7
A1	140	467	925	426
A2	135	482	710	808
A3	264	358	543	420
A4	209	256	349	980
A5	219	432	596	423
A6	261	311	620	590
Aritmetička sredina	204.7	384.3	623.8	607.8
Standardna devijacija	56.5	90.8	190.3	237.2
SHAM Dani	1	2	5	7
S1	232	243	219	339
S2	254	198	166	120
S3	290	313	683	273
S4	213	204	358	480
S5	302	256	265	234
Aritmetička sredina	258.2	242.8	338.2	289.2
Standardna devijacija	37.7	46.4	205.2	133.1
P-vrijednost*	0.095	0.011	0.044	0.023

\*na osnovi Student t-testa za usporedbu među skupinama



Grafikon 1. Usporedba plazmatskih koncentracija CK-MB (µg/mL) u životinja s eksperimentalno izazvanim AIM-om s onima iz sham skupine u više vremenskih točaka tijekom 7 dana nakon zahvata;

\* $P < 0.05$  za sve usporedbe u odnosu na sham skupinu (Student t-test)

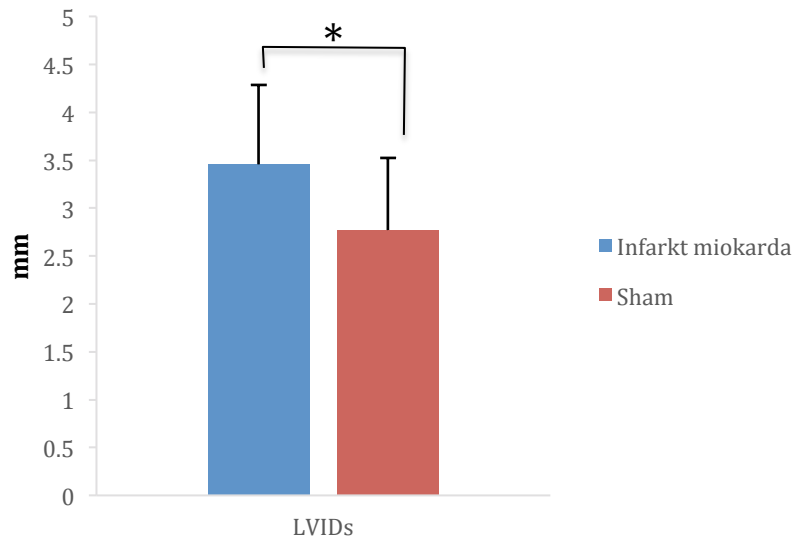
**Tablica 5. Usporedba vrijednosti srčanih parametara mjerenih UZV-om (unutrašnje dimenzije lijevog ventrikula u sistoli i dijastoli (LVIDs i LVIDd), debljina intraventrikulskog septuma u sistoli i dijastoli (IVSs i IVSd), debljina stražnje stijenke lijeve klijetke u sistoli i dijastoli (LVPWs i LVPWd) te ejeleksijska frakcija (EF) i frakcija skraćenja (FS) u životinja s eksperimentalno izazvanim AIM-om sa sham skupinom životinja**

SHAM		IVSd (mm)	LVIDd (mm)	LVPWd (mm)	IVSs (mm)	LVIDs (mm)	LVPWs (mm)	EF (%)	FS (%)
1	s1	0.6	5	0.9	1.7	2.4	2.5	87.4	51.4
2	s2	1.3	6	2.3	2.9	3	2.3	86.1	50
3	s3	1.4	5	2.1	2.3	2.7	2.4	82.9	45.9
4	s1	1.3	3.77	1.37	2.37	2.03	2.1	85.9	49.43
5	s2	1.2	4.1	1.23	2.07	2.13	2.2	85.17	48.37
6	s3	1.27	5.5	1.53	2.1	2.7	2.87	86.43	50.47
7	s4	1.2	4.1	1.33	2.1	2.07	2.17	86.03	49.47
8	s5	1.33	5.17	1.93	2.56	2.2	2.97	91.27	57.6
9	L1	1.1	4.1	1.5	1.7	1.9	1.9	89.3	53.8
10	L3	1.3	5.8	2.1	2.5	2.9	3.1	86.8	50.8
11	L4	1.3	5.2	1.9	2.4	2.4	3.3	88.7	53.2
12	S1	1.1	5	1.7	2.4	2.3	2.9	88.4	52.7
13	S2	1.7	6.4	2.2	2.5	4.1	3.1	71.8	36.1
14	S3	1.5	6.6	2.5	2.3	4.1	3	73.8	37.8
15	S4	1.6	6.8	1.4	2.7	3.5	3.3	84.3	48
16	S5	1.6	6.7	1.8	2.6	3.9	3.6	77.8	41.3
AS		1.3	5.328	1.737	2.325	2.771	2.732	84.50 6	48.52 1
SD		0.256	0.995	0.441	0.329	0.751	0.509	5.476	5.769
AIM		IVSd (mm)	LVIDd (mm)	LVPWd (mm)	IVSs (mm)	LVIDs (mm)	LVPWs (mm)	EF (%)	FS (%)
17	A1	1.5	7.8	2.1	2.9	4.7	3	75	39.1
18	A3	1.4	6.8	1.8	2.5	3.9	3.3	79.7	43.1
19	A4	1.1	6.4	2.3	2.7	2.9	3.6	89.1	54.2
20	A5	1.7	6.9	1.9	2.6	4.3	2.8	73.6	37.7
21	A6	1.5	7.1	2.6	2.8	4.5	3.3	73.3	37.5
22	D1	1.3	7	2.2	1.5	4.2	3.7	76.2	40
23	D2	1.1	6.2	1.5	2.1	4	2.7	71.5	35.9
24	D5	1.3	7.1	2	2.4	4.4	3.4	73.9	38
25	D6	1.8	7	1.9	3	4	3.3	78.8	42.3
26	c1	1	4.8	2	0.9	3.5	3	60.5	27.8
27	c2	0.9	5.4	1.5	1.1	3.5	2.7	71.7	35.8
28	c3	1.1	6.2	1.7	1.3	3.8	10	74.2	38
29	c14	1.33	5.53	2.1	2.23	2.87	2.7	84.63	48.27
30	c16	1.3	4.97	1.67	2.23	2.4	2.4	87.47	51.57
31	c17	1.13	4.13	1.27	1.9	2.33	1.97	80	42.87
32	c18	1.33	4.6	1.63	1.87	2.9	4.97	72.7	36.43
33	c19	1.43	4.27	1.73	2.03	2.4	2.5	80.83	43.67
34	c20	1.4	4.6	1.73	2.56	2	2.9	90.33	56.07
35	c21	1.33	4.97	1.27	1.97	3.03	4.9	74.9	38.4

AS	1.313	5.883	1.837	2.136	3.454	3.534	77.28 2	41.40 4
SD	0.227	1.146	0.343	0.604	0.832	1.738	7.170	6.993
P- vrijednost*	0.873	0.139	0.456	0.274	<b>0.016</b>	0.084	<b>0.002</b>	<b>0.003</b>

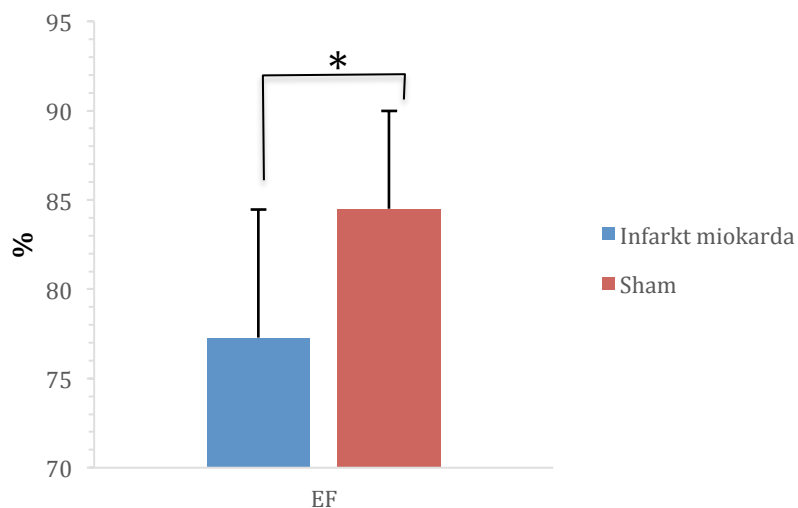
AS – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija,

\*na osnovi Student t-testa za usporedbu među skupinama



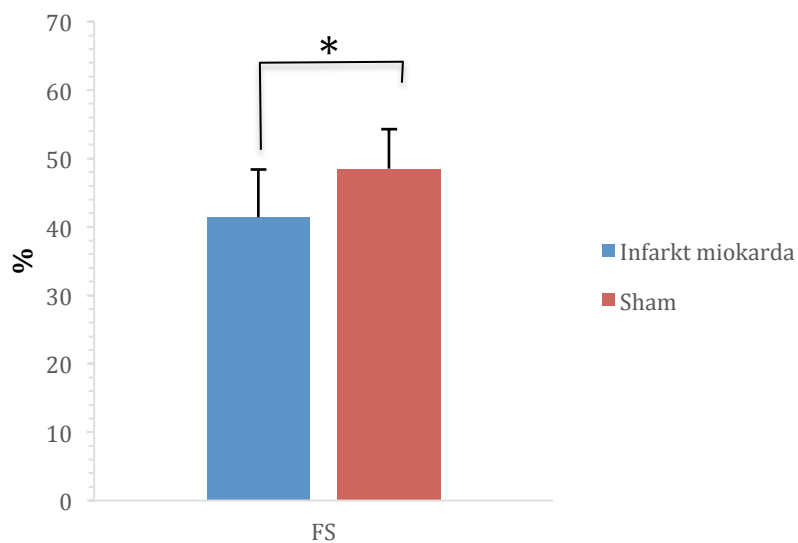
\* $P=0.016$  u odnosu na sham skupinu (Student t-test)

Grafikon 2. Usporedba vrijednosti unutrašnje dimenzije lijevog ventrikula u sistoli (LVIDs) u životinja s eksperimentalno izazvanim AIM-om i onih iz sham skupine



*\*P=0.002 u odnosu na sham skupinu (Student t-test)*

**Grafikon 3. Usporedba ejekcijske frakcije (EF, %) u životinja s eksperimentalno izazvanim AIM-om s onima iz sham skupine**



*\*P=0.003 u odnosu na sham skupinu (Student t-test)*

**Grafikon 4. Usporedba frakcije skraćivanja (FS, %) u životinja s eksperimentalno izazvanim AIM-om s onima iz sham skupine**

Navedeni rezultati laboratorijskih vrijednosti enzima kao i UZV izmjereni parametri srčane funkcije govore u prilog jasnih znakova infarkta miokarda u životinja u kojih je podvezivanjem koronarne arterije eksperimentalno izveden infarkt.

Laboratorijske vrijednosti enzima koreliraju s vrijednostima u ljudskoj populaciji. Povišene vrijednosti specifičnih enzima za srce u životinja s operativno izazvanim IM ukazuju na značajno oštećenje stanica miokarda. UZV vrijednosti mjerenih parametara, ponajviše EF i FS, ukazuju na znatan pad tih vrijednosti u operiranih životinja. Dobiveni rezultati govore u prilog težem funkcionalnom oštećenju čime se potvrđuju posljedice infarkta miokarda.

Učinjena histološka analiza srca jasno je pokazala da je kod svih operiranih životinja u kojih je podvezana koronarna arterija došlo i do infarkta miokarda .

## **5.2. Promjena vrijednosti srčanih enzima i ultrazvučnih parametara uz primjenu specifičnih BMP1-3 protutijela nakon eksperimentalno izazvanog akutnog infarkta miokarda**

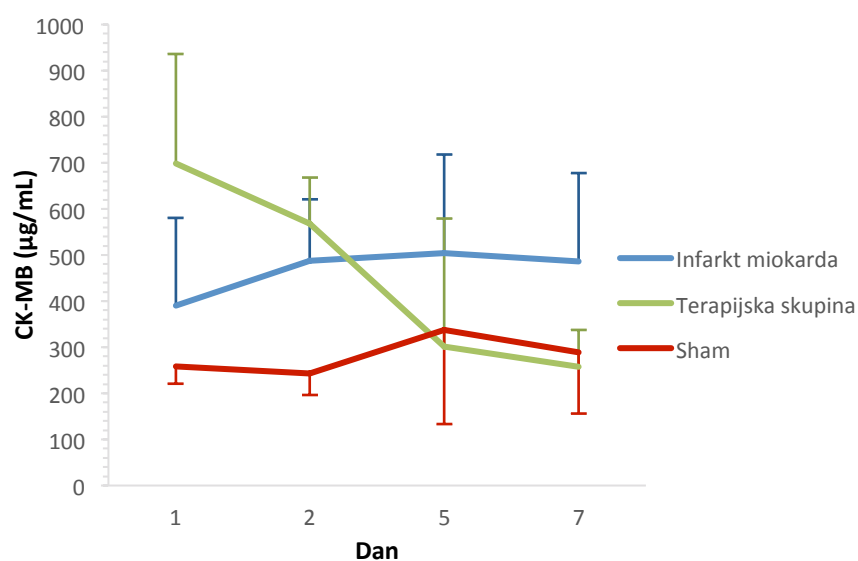
U Tablici 6. te na Grafikonu 5. prikazane su plazmatske koncentracije CK-MB u životinja s eksperimentalno izazvanim AIM i skupine sham životinja te u tretiranih protutijelima koštanih morfogenetskih proteina BMP1-3 (terapija) tijekom 7 dana nakon zahvata u više vremenskih točaka (nakon 1, 2, 5 i 7 dana). Iz Tablice 6. (te Grafikona 5.) vidljiva je statistički značajno različita vremenska dinamika plazmatskih koncentracija CK-MB među ispitivanim skupinama životinja ( $P=0.003$ , Anova za ponovljena mjerenja). Iz iste tablice i grafikona također je vidljivo da nakon početnog porasta koncentracije CK-MB u životinja tretiranih protutijelima koštanih morfogenetskih proteina nakon eksperimentalno izazvanog AIM (1 dan;  $698.8 \pm 237.1$ ,  $P=0.004$  prema AIM,  $P=0.001$  prema sham) dolazi do postepenog pada koncentracije CK-MB koja je nakon 2 dana usporediva s koncentracijom u AIM skupini ( $567.8 \pm 100.2$  prema  $486.9 \pm 134.5$ ,  $P=0.196$ ) iako statistički značajno viša od životinja u sham skupini ( $567.8 \pm 100.2$  prema  $242.8 \pm 46.4$ ,  $P<0.001$ ). Od 5. do 7. dana bilježi se pad koncentracije CK-MB u životinja tretiranih protutijelima koštanih morfogenetskih proteina (terapija) na razini usporedivu sa sham skupinom (5. dan,  $301 \pm 278.7$  prema  $338.2 \pm 205.2$ ,  $P=0.797$ ; 7. dan,  $257.6 \pm 79.6$  prema  $289.2 \pm 133.1$ ,  $P=0.765$ ), a granično te statistički značajno niže koncentracije u odnosu na AIM skupinu (5. dan,  $301 \pm 278.7$  prema  $504.4 \pm 213$ ,  $P=0.098$ ; 7. dan,  $257.6 \pm 79.6$  prema  $486.5 \pm 191.3$ ,  $P=0.015$ ).

Tablica 6. Usporedba plazmatskih koncentracija CK-MB ( $\mu\text{g/mL}$ ) u životinja s eksperimentalno izazvanim AIM, u sham skupine te u tretiranih protutijelima koštanih morfogogenetskih proteina BMP1-3 (terapija) tijekom 7 dana nakon zahvata u više vremenskih točaka

No	Oznaka	Grupa	Dani / CK-MB $\mu\text{g/mL}$			
			1	2	5	7
1	S1	sham	232	243	219	339
2	S2	sham	254	198	166	120
3	S3	sham	290	313	683	273
4	S4	sham	213	204	358	480
5	S5	sham	302	256	265	234
Aritmetička sredina			258.2	242.8	338.2	289.2
Standardna devijacija			37.7	46.4	205.2	133.1
6	A1	AIM	140	467	925	426
7	A2	AIM	135	482	710	808
8	A3	AIM	264	358	543	420
9	A4	AIM	209	256	349	980
10	A5	AIM	219	432	596	423
11	A6	AIM	261	311	620	590
12	nr 11	AIM	253	631		278
13	nr 12	AIM	838	589		169
14	nr 14	AIM	323	734		255
15	nr 16	AIM	422	533		146
16	1	AIM	712	649	611	420
17	2	AIM	636	333	441	237
18	3	AIM	437	478	661	487
19	4	AIM	565	562	411	430
20	5	AIM	587	590	470	401
21	6	AIM	382	634	450	452
22	7	AIM	402	612	153	372
23	8	AIM	512	652	121	365
Aritmetička sredina			390.1	486.9	504.4	486.5
Standardna devijacija			190.7	134.5	213	191.3
24	nr 2	terapija	215	345		84
25	nr 3	terapija	508	563		101
26	nr 5	terapija	333	390		103
27	nr 6	terapija	379	517		199
28	nr 7	terapija	402	366		182
29	nr 8	terapija	452	429		204

30	nr 9	terapija	348	483		126
31	A	terapija	792	507	750	298
32	B	terapija	631	667	380	360
33	G	terapija	929	423	112	263
34	F	terapija	822	621	62	150
35	H	terapija	320	621	201	217
Aritmetička sredina			698.8	567.8	301	257.6
Standardna devijacija			237.1	100.2	278.7	79.6
P-vrijednost među skupinama			0.003	<0.001	0.162	0.018
P-vrijednost za usporedbu terapija i kontrola			0.004	0.196	0.098	0.015
P-vrijednost za usporedbu terapija i sham			0.001	<0.001	0.797	0.765
P-vrijednost§			0.003			

§ - na osnovi analize varijance za ponovljena mjerenja za usporedbu vremenskog slijeda među skupinama



*Grafikon 5. Usporedba plazmatskih koncentracija CK-MB (µg/mL) u životinja s eksperimentalno izazvanim AIM-om, u sham skupine te u tretiranih protutijelima koštanih morfogenetskih proteina (terapija) tijekom 7 dana nakon zahvata u više vremenskih točaka; P=0.003 za usporedbu među skupinama za vremenski slijed, analiza varijance za ponovljena mjerenja*

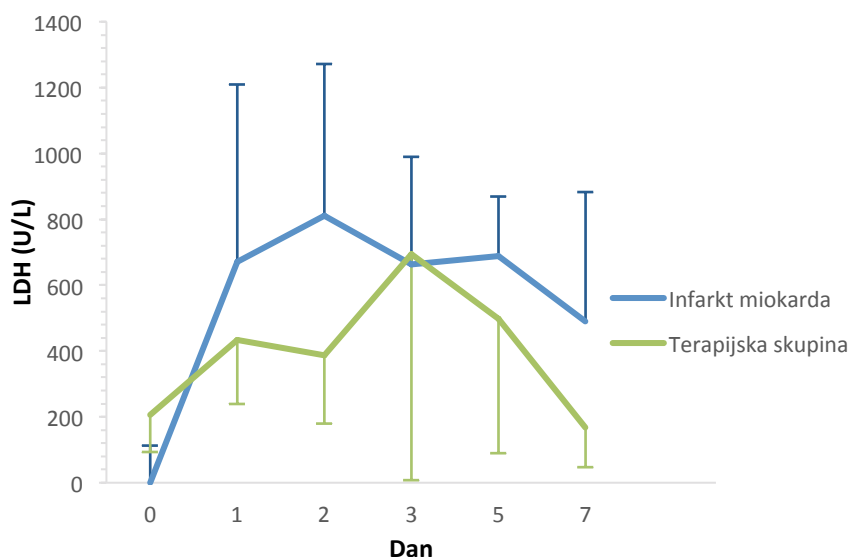


U Tablici 7. te na Grafikonu 6. prikazane su plazmatske koncentracije LDH u životinja s eksperimentalno izazvanim AIM-om te u tretiranih protutijelima koštanih morfogenetskih proteina BMP1-3 (terapija) prije te tijekom 7 dana nakon zahvata u više vremenskih točaka (nakon 1, 2, 3, 5 i 7 dana). Iz Tablice 7 (te Grafikona 6.) vidljiva je statistički značajno različita vremenska dinamika plazmatskih koncentracija LDH među ispitivanim skupinama životinja ( $P=0.022$ , anova za ponovljena mjerenja) uz prosječno niže vrijednosti LDH u skupini životinja tretiranih protutijelima koštanih morfogenetskih proteina (terapija) nakon zahvata uz statistički značajno niže koncentracija LDH 2. i 7. dana nakon zahvata (2. dan,  $810.5 \pm 461.8$  prema  $378.1 \pm 207.5$ ,  $P=0.026$ ; 7. dan,  $489.5 \pm 392.7$  prema  $167.8 \pm 120.6$ ,  $P=0.028$ ).

*Tablica 7. Usporedba plazmatskih koncentracija LDH (U/L) u životinja s eksperimentalno izazvanim AIM-om te u tretiranih protutijelima koštanih morfogenetskih proteina (terapijska skupina) prije te tijekom 7 dana nakon zahvata u više vremenskih točaka*

No	Oznaka	Grupa	Dani/ LDH (U/L)					
			0	1	2	3	5	7
1	nr 11	AIM	184	331	176	449		168
2	nr 12	AIM	256	258	449	348		55
3	nr 14	AIM	274	522	592	614		201
4	nr 16	AIM	133	409	258	553		89
5	1	AIM	457	923	1012	1112	525	1054
6	2	AIM	334	839	1100	1059	931	977
7	3	AIM	79	1937	1389	643	586	955
8	4	AIM	240	1427	1600	1307	729	994
9	5	AIM	97	57	767	707	962	419
10	6	AIM	313	354	365	301	723	231
11	7	AIM	291	562	788	446	543	489
12	8	AIM	362	428	1230	422	511	242
Aritmetička sredina			251.7	670.6	810.5	663.4	688.8	489.5
Standardna devijacija			112.6	538.6	461.8	326.3	179.8	392.7
13	A	terapija	457	626	345	2288	1090	415
14	B	terapija	334	517	479	373	294	228
15	G	terapija	79	716	208	1590	724	246
16	F	terapija	240	789	619	107	60	55
17	H	terapija	97	406	792	1471	321	350
18	nr 2	terapija	117	198	116	379		39
19	nr 3	terapija	102	236	170	321		72
20	nr 5	terapija	232	441	413	323		83
21	nr 6	terapija	244	239	128	281		141
22	nr 7	terapija	192	403	472	419		103
23	nr 8	terapija	271	291	521	357		97
24	nr 9	terapija	116	334	382	428		184
Aritmetička sredina			206.8	433	387.1	694.8	497.8	167.8
Standardna devijacija			113.6	194.1	207.5	687.7	408.1	120.6
P-vrijednost*			0.272	0.260	0.026	0.194	0.341	0.028
P-vrijednost§			0.022					

§ - izračunato na temelju analize varijance za ponovljena mjerenja, \* - post-hoc analiza

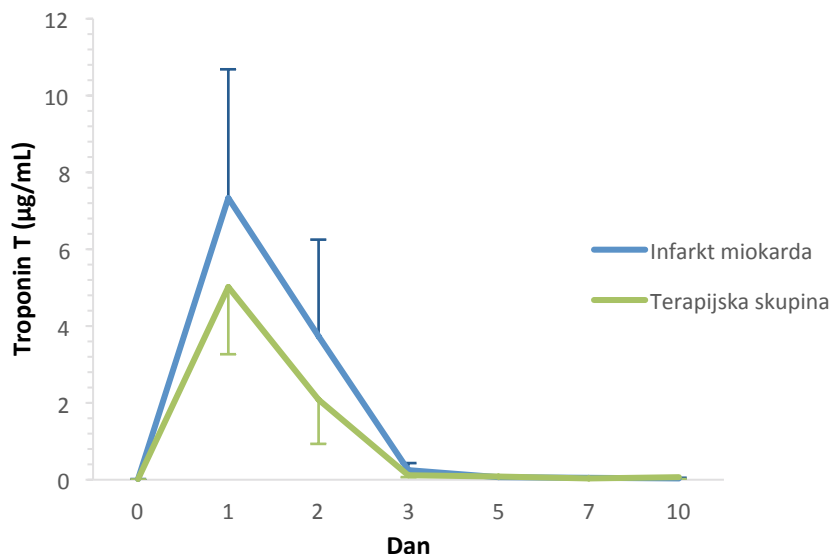


*Grafikon 6. Usporedba plazmatskih koncentracija LDH (U/L) u životinja s eksperimentalno izazvanim AIM te u tretiranih protutijelima koštanih morfogenetskih proteina (terapijska skupina) prije te tijekom 7 dana nakon zahvata u više vremenskih točaka;  $P=0.022$  za usporedbu među skupinama za vremenski slijed, analiza varijance za ponovljena mjerenja*

U Tablici 8. te na Grafikonu 7. prikazane su plazmatske koncentracije troponina-t u životinja s eksperimentalno izazvanim AIM te u tretiranih protutijelima koštanih morfogenetskih proteina BMP1-3 (terapija) prije te tijekom 10 dana nakon zahvata u više vremenskih točaka (nakon 1, 2, 3, 5, 7 i 10 dana). Iz iste tablice i grafikona je vidljiva statistički značajno različita vremenska dinamika plazmatskih koncentracija troponina-t među ispitivanim skupinama životinja ( $P=0.006$ , anova za ponovljena mjerenja) uz prosječno niže vrijednosti troponina-t u skupini životinja tretiranih protutijelima koštanih morfogenetskih proteina (terapija) nakon zahvata uz statistički granično niže koncentracije troponina-t 1. i 3. dana nakon zahvata (1. dan,  $5.016 \pm 1.754$  prema  $7.34 \pm 3.351$ ,  $P=0.089$ ; 3. dan,  $0.1111 \pm 0.0431$  prema  $0.2433 \pm 0.1883$ ,  $P=0.071$ ).

*Tablica 8. Usporedba plazmatskih koncentracija troponina-t  $\mu\text{g/mL}$  u životinja s eksperimentalno izazvanim AIM-om te u tretiranih protutijelima koštanih morfogenetskih proteina (terapija) prije te tijekom 10 dana nakon zahvata u više vremenskih točaka*

<b>AIM</b>	<b>dan 0</b>	<b>dan 1</b>	<b>dan 2</b>	<b>dan 3</b>	<b>dan 5</b>	<b>dan 7</b>	<b>dan 10</b>
rat 11	0.008	2.97	1.32	0.05	0.05	0.01	0.01
rat 12	0.009	4.54	2.75	0.17	0.07	0.1	0.07
rat 13	0.008	7.32	2.19	0.15	0.06	0.11	0.02
rat 15	0.012	12.4	6.13	0.33	0.12	0.04	0.03
rat 16	0.007	8.85	2.24	0.17	0.06	0.04	0.02
rat 17	0.007	3.84	0.97	0.05	0.02	0.01	0.05
rat 18	0.009	8.9	5.8	0.4	0.07	0.05	0.03
rat 19	0.011	11.54	8.36	0.64	0.09	0.06	0.02
rat 20	0.007	5.7	3.91	0.23	0.09	0.03	0.05
Aritmetička sredina	0.0087	7.34	3.7411	0.2433	0.07	0.05	0.0333
Standardna devijacija	0.0018	3.3510	2.5122	0.1883	0.0283	0.0354	0.0194
<b>Terapija</b>	<b>dan 0</b>	<b>dan 1</b>	<b>dan 2</b>	<b>dan 3</b>	<b>dan 5</b>	<b>dan 7</b>	<b>dan 10</b>
rat 1	0.007	6.81	3.14	0.21	0.13	0.02	0.08
rat 2	0.008	5.46	2.02	0.09	0.1	0.04	0.02
rat 3	0.012	6.95	3.01	0.15	0.05	0.03	0.06
rat 4	0.007	7.03	4.24	0.1	0.11	0.03	0.04
rat 5	0.009	2.51	0.68	0.08	0.02	0.02	0.14
rat 6	0.009	4.13	1.38	0.07	0.05	0.04	0.02
rat 7	0.008	4.95	1.65	0.1	0.08	0.08	0.03
rat 8	0.011	4.79	1.78	0.1	0.12	0.02	0.16
rat 10	0.007	2.51	0.92	0.1	0.08	0.02	0.02
Aritmetička sredina	0.0087	5.0156	2.0911	0.1111	0.0822	0.0333	0.0633
Standardna devijacija	0.0018	1.7540	1.1579	0.0431	0.0367	0.0194	0.0534
P-vrijednost*	1	0.089	0.100	0.071	0.441	0.238	0.144
P-vrijednost§	0.006						



*Grafikon 7. Usporedba plazmatskih koncentracija troponina-t u životinja s eksperimentalno izazvanim AIM-om te u tretiranih protutijelima koštanih morfogenetskih proteina (terapijska skupina) prije te tijekom 10 dana nakon zahvata u više vremenskih točaka;  $P=0.006$  za usporedbu među skupinama za vremenski slijed, analiza varijance za ponovljena mjerenja*

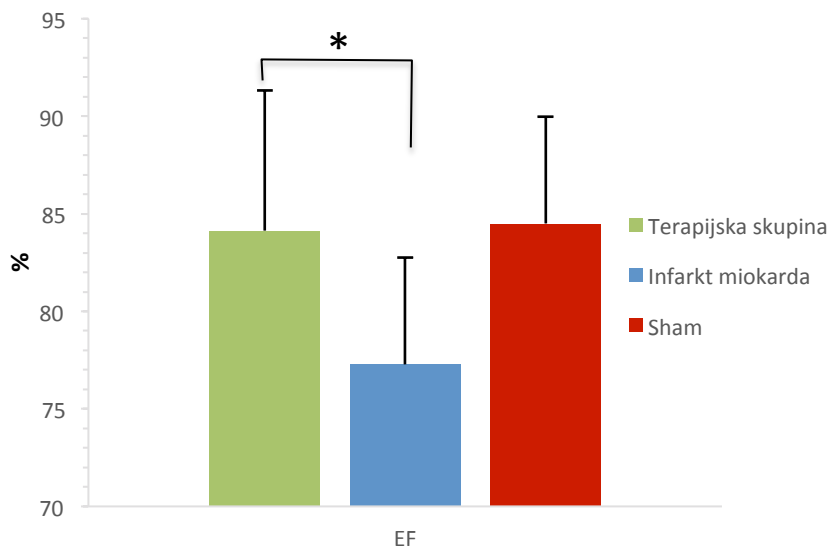
U Tablici 9. te na Grafikonu 8. i 9. prikazane su vrijednosti srčanih parametara mjerenih UZV-om (unutrašnje dimenzije lijevog ventrikula u sistoli i dijasoli (LVIDs i LVIDd), debljina intraventrikulskog septuma u sistoli i dijasoli (IVSs i IVSd), debljina stražnje stijenke lijeve klijetke u sistoli i dijasoli (LVPWs i LVPWd) te ejekcijska frakcija (EF) i frakcijsko skraćenje (FS) u životinja s eksperimentalno izazvanim AIM tretiranih protutijelima koštanih morfogenetskih proteina (terapija) uz usporedbu s netretiranim životinjama (AIM) te sham skupinom. Iz Tablica 4. i 9. vidljivo je da su za unutrašnje dimenzije lijevog ventrikula u sistoli i dijasoli (LVIDs i LVIDd), debljinu intraventrikulskog septuma u sistoli i dijasoli (IVSs i IVSd), debljina stražnje stijenke lijeve klijetke u sistoli i dijasoli (LVPWs i LVPWd) utvrđene usporedive veličine navedenih parametara među ispitivanim skupinama životinja ( $P=0.738$ ,  $P=0.334$ ,  $P=0.199$ ,  $P=0.088$ ,  $P=0.078$ ,  $P=0.110$ ; ANOVA;

susljedno). Iz istih tablica te Grafikona 8. i 9. također je vidljivo kako je utvrđena statistički značajna razlika veličine ejekeijske frakcije (EF) i frakcijskog skraćenja (FS) među ispitivanim skupinama životinja ( $P=0.009$ ,  $P=0.005$ , ANOVA) i to na način da su EF i FS bile statistički značajno snižene u AIM skupini životinja u odnosu na životinje u sham skupini ( $P=0.002$ ,  $P=0.003$ ) te terapijskoj skupini ( $P=0.015$ ,  $P=0.006$ ) dok su vrijednosti bile usporedive za terapijsku i sham skupinu ( $P=0.896$ ,  $P=0.904$ ).

*Tablica 9. Vrijednosti srčanih parametara mjerenih UZV-om (unutrašnje dimenzije lijevog ventrikula u sistoli i diastoli (LVIDs i LVIDd), debljina intraventrikulskog septuma u sistoli i diastoli (IVSs i IVSd), debljina stražnje stijenke lijeve klijetke u sistoli i diastoli (LVPWs i LVPWd) te ejekeijska frakcija (EF) i frakcijsko skraćenje (FS) u životinja s eksperimentalno izazvanim IM-om tretiranih protutijelima koštanih morfogenetskih proteina (terapija) te usporedba s neliječenim životinjama (AIM) te sham skupinom*

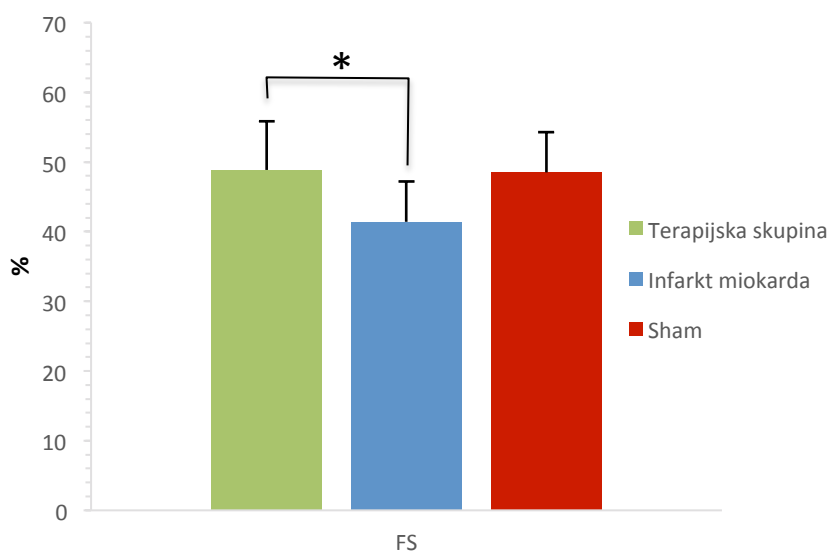
Terapija		IVSd (mm)	LVIDd (mm)	LVPWd (mm)	IVSs (mm)	LVIDs (mm)	LVPWs (mm)	EF (%)	FS (%)
1	t1	1.3	7	1.5	2.6	3.6	3	84.3	48.1
2	t2	1.5	5.4	1.9	2.9	2.5	2.7	88.6	53.1
3	t3	1.3	5.4	2	2.4	2.5	3.1	89	53.7
4	t4	1.4	5.7	1.2	2.9	2.5	2.4	90.8	56.5
5	t5	1.37	4.73	1.57	2.47	2.27	4.67	87.67	51.73
6	t6	1.27	4.33	1.13	2.27	1.97	2.2	89.77	54.73
7	t7	1.53	4.6	1.47	2.5	2.1	2.5	89.3	53.87
8	t8	1.4	5.43	1.67	2.1	2.83	3.1	84.3	47.73
9	t9	1.47	5.4	1.77	2.83	2.5	2.6	88.93	53.6
10	A1	1.3	5.4	1.5	2.8	2.9	2.4	84.2	47.5
11	B1	1.3	5.6	1.6	2.1	3.4	2.3	75.8	39.3
12	F1	1.2	8.5	1.8	2.3	6.3	2.9	57	26.3
AS		1.362	5.624	1.593	2.514	2.948	2.823	84.13	48.84
SD		0.101	1.125	0.260	0.294	1.161	0.660	9	7
ANOVA P-vrijednost*		0.738	0.334	0.199	0.088	0.078	0.110	0.009	0.005
P-vrijednost <sup>§</sup> prema kontroli		NP	NP	NP	NP	NP	NP	0.015	0.006
P-vrijednost <sup>§</sup> prema sham		NP	NP	NP	NP	NP	NP	0.896	0.904

\*- na osnovi analize varijance (ANOVA) za usporedbu među skupinama; § - post-hoc analiza



*\*P=0.006 za usporedbu terapije s kontrolom – post-hoc analiza, P=0.904 za usporedbu terapije sa sham skupinom – post-hoc analiza*

*Grafikon 8. Usporedba ejekcijske frakcije (EF, %) u životinja s eksperimentalno izazvanim IM-om, tretiranih protutijelima koštanih morfogenetskih proteina (terapijska skupina) te sham skupinom; P=0.009 među skupinama (ANOVA)*



*\*P=0.015 za usporedbu terapije s kontrolom – post-hoc analiza, P=0.896 za usporedbu terapije sa sham skupinom – post-hoc analiza*

*Grafikon 9. Usporedba frakcijskog skraćivanja (FS, %) u životinja s eksperimentalno izazvanim IM-om, tretiranih protutijelima koštanih morfogenetskih proteina (terapijska skupina) te sham skupinom; P=0.005 među skupinama (ANOVA)*

Rezultati dobiveni uspoređujući tri skupine životinja (sham skupinu, životinje s izazvanim IM te životinje s izazvanim IM uz primjenu specifičnih protutijela na BMP1-3) govore o jasnoj ulozi molekule BMP1-3 u oštećenju srca kao posljedici remodeliranja uslijed fibroze. Naime, rezultati za životinje s izazvanim IM bez terapije govore u prilog znatnijeg srčanog oštećenja. Povišene vrijednosti CK-MB, LDH i troponina-t od kojih zadnja dva gotovo i ne postoje u cirkulaciji zdravih jedinki jasno ukazuju na znakove propadanja stanica srčanog mišića. UZV parametri mjereni standardnim postupkom za tu metodu samo potvrđuju funkcionalno oštećenje.

Zanimljivo je da laboratorijske vrijednosti specifičnih srčanih enzima u životinja u kojih je izazvan IM a primali su terapiju specifičnim protutijelima na BMP1-3 također pokazuju odstupanje od normalnih vrijednosti ali da je ono puno manje u odnosu na životinje bez terapije. Isto govori kako je evidentno došlo do oštećenja stanica miokarda ali da je vjerojatno proces njihove degradacije i remodeliranja u sklopu fibroznog procesa znatno manji.

Najzanimljivije su vrijednosti EF i FS kao UZV parametara funkcije srca gdje se u operiranim životinja koje su primale terapiju i životinja iz sham skupine ne nalazi statistički značajnog odstupanja. Za razliku od onih s izazvanim IM bez terapije gdje su mjerene vrijednosti znatno manje. Isto ukazuje da je funkcija srca unatoč izazvanom infarktu slična u prvim dvjema skupinama tj. da je utjecaj terapije protutijelima značajan faktor u smanjenju oštećenja miokarda uslijed remodeliranja nakon IM.

Histološki su u svih operiranih životinja nađeni znaci infarkta miokarda.



## 6. RASPRAVA

Akutni infarkt miokarda (AIM) jedan je od vodećih uzroka smrtnosti u razvijenim zemljama i jedan od glavnih problema javnoga zdravstva općenito. Najčešće nastaje zbog okluzije koronarne arterije uzrokovane aterosklerozom. Nedostatna opskrba srčanih stanica krvlju neizbježno dovodi do njihove smrti i razgradnje (19,20). Na mjestu infarkta, zbog inicijalnog upalnog odgovora, u daljnjim fazama dolazi do remodeliranja tkiva te nastaje fibrozni ožiljak u čijoj je podlozi promjena u ekstracelularnom matriksu (ECCM) kao osnovnoj strukturalnoj jedinici. Posljedica toga je pogoršanje srčane funkcije, što bez medicinske intervencije uglavnom vodi zatajivanju srca povećavajući tako morbiditet i mortalitet tih bolesnika (23,24).

Očuvanje funkcije srčane pumpe nakon AIM, a samim time i preživljenje, ovisi izravno o brzini reperfuzije nakon opstrukcije koronarne arterije (39). Moderna terapija u prvom redu podrazumjeva hitnu perkutanu angioplastiku s postavljanjem stenta, a alternativno fibrinolizu ili kardiokiruršku revaskularizaciju (41,42). Ostali lijekovi koji se primjenjuju nakon AIM, uključuju ACE inhibitore, beta-blokatore ili antagoniste kalcijevih kanala. Svi oni djeluju na smanjenje volumnog opterećenja srca te time i na smanjenje energetske potrebe i zaustavljanje pogoršanja posljedica AIM. Također se primjenjuju lijekovi koji smanjuju ili preveniraju aterosklerozu, poput statina i fibrata (50,51).

Unatoč činjenici da se trenutno u svijetu provodi oko petstotinjak kliničkih studija koje se bave kardiovaskularnom patologijom, od kojih se oko tri stotine njih bavi konkretno lijekovima a još nekih stotinu pedeset mogućim

terapeutskim učincima raznih molekula, nema nijednog registriranog kliničkog pokusa kojem je cilj prevencija ili smanjenje fibroze (53). Dodatno, u kliničkoj medicini ne postoji nijedan odobreni lijek koji sprječava nakupljanje ožiljkastoga tkiva u parenhimatoznim ili mišićnim organima kao posljedica ozljede i/ili upale.

BMP1 je metaloproteinaza koja omogućuje stvaranje zrelih monomera glavnih vlaknastih kolagena I-III te tako sudjeluje u regulaciji strukture izvanstaničnog matriksa (106). Stanice srca stvaraju i različito reagiraju na molekule izvanstaničnog matriksa koji osigurava mehaničku, električnu i kemijsku homeostazu srca. Kao posljedica infarkta srca miociti u infarciranoj zoni nekrotiziraju, u okolnom tkivu parcijalno podliježu apoptozi, prokrvljenost se smanjuje, da bi se nakon uključenja mehanizama popravka razmnožili fibroblasti te stvorili povećanu količinu kolagena i ožiljkastog tkiva. Stvaranje manje vrijednoga tkiva u stijenci miokarda uzrokom je slabljenja srčane funkcije pa bi usporavanje procesa ožiljkavanja, uz povećano preživljenje normalnog miokarda omogućilo očuvanje funkcije srca (25).

U istraživanju u ovoj disertaciji oslanjamo se na znanja i podatke prikupljene višegodišnjim istraživanjima uloga izoformi BMP1 kao i tehnologije terapijske primjene monoklonskih protutijela u novim indikacijskim područjima. Specifičnosti inovacije koju predlaže ovaj rad u mogućoj terapijskoj primjeni sastoje se od: novog pristupa smanjenju posljedica akutnog infarkta miokarda preko inhibicije proteina BMP1-3 i njegova signalnog puta specifičnim monoklonskim protutijelima čime bi se spriječilo ili moglo smanjiti infarcirano područje i ožiljkasto remodeliranje u srčanom mišiću i tako poboljšati funkcija srca. Dosadašnji rezultati istraživanja uloge

BMP1-3 govore u prilog njegove bitne uloge u fibrogenezi. Dokazano je da u krvi postoje cirkulirajući oblici BMP1-3 (122). Upravo taj cirkulirajući protein ima veliko značenje u regulaciji i modeliranju ekstracelularnog matriksa. Njegova pojačana aktivnost dovodi do fibroze. Dokazano je da povećanje količine BMP1-3 u krvi pridonosi povećanju renalne fibroze u bubregu i posljedično razvoju kronične renalne bolesti (122). Analogno tome, primjena BMP1-3 neutralizirajućeg protutijela u bolesnih životinja smanjila je fibrozu, sačuvala renalnu funkciju te povećala preživljenje. Zaključuje se stoga da inhibicija cirkulirajućeg BMP 1-3 smanjuje pogoršanje osnovne bolesti i predstavlja cilj u liječenju kronične bubrežne bolesti.

Dodatna istraživanja s BMP1-3 pokazala su njegovu prisutnost u slučajevima koštanog prijeloma na ekstremitetima. Dokazana je ključna uloga BMP1-3 u cijeljenju koštanih prijeloma femura štakora i ulne kunića (121). U navedenom istraživanju je inhibicija BMP1-3 dovela do usporenog i otežanog cijeljenja kosti. Stimulacija koštane formacije primjenom BMP1-3 na mjestu prijeloma dovela je do premoštenja defekta, primarno preko stimulacije diferencijacije osteoblasta. Sve navedeno navodi na zaključak kako je uloga proteina BMP1-3 u procesu fibroze u tijelu važna ako ne i ključna. Time smo se rukovodili i pri postavljanju hipoteze za ovo istraživanje.

Kako je u serumu ljudi s akutnim infarktom srca pronađena povišena razina izoforme BMP 1-3 (123), u našem istraživanju na štakorima s akutnim infarktom srca pokušali smo dokazati učinkovitost monoklonskog protutijela na protein BMP1-3.

Inhibicija BMP1-3, kao važne molekule u fibrinogenezi, vjerojatno izravno utječe na veličinu ožiljka i njegov sastav te prijeći prekomjerno

nakupljanje vezivnog tkiva. Kao što smo već spomenuli, sastav ECCM i količina svih njegovih komponenti izravno utječe na ponašanje ožiljka, na njegovu mogućnost za remodeliranje, pa tako i na promjenu sastava s regeneriranim mišićnim tkivom (126).

Da bismo ostvarili postavljene ciljeve istraživanja, bilo je prije svega potrebno uspostaviti dobar eksperimentalni model infarkta miokarda. Odlučili smo se na prethodno opisan i adekvatno validiran model ligacije koronarne arterije. Planiranje operacija, tretiranje životinja i uzimanje krvi u svrhu analize te kontrola ultrazvučnih parametara i PHD analiza provedeni su u skladu s jasnim već opisanim protokolom uz opsežnu dokumentaciju. Daljnja patohistološka analiza pokazala je kako je u svih operiranih životinja eksperimentalno izazvan infarkt. U ovom istraživanju nismo se bavili složenom molekularnom razinom uloge proteina BMP1-3 budući da dosadašnja istraživanja upućuju na dvojake učinke u signalnom slijedu preko pojedinih proteina koji pak imaju modulacijske učinke na metaloproteinaze kao što je BMP1 (134). Iz njih je jedino jasno dokazana direktna uloga BMP1 u pregradnji ECCM u srčanom mišiću poslije infarkta, a potom na poboljšanu funkciju srca. Također je dokazano da izrazito visoke koncentracije navedenih modulirajućih proteina mogu zaustaviti djelovanje BMP1 (135).

Vodeći se tim činjenicama, primijenili smo standardnu koncentraciju monoklonskog protutijela radi inaktivacije proteina BMP1-3.

Razvojem specifičnih životinjskih modela i slijedom navedenih rezultata s modulacijom proteina koji imaju ulogu u aktivaciji BMP1-3, nastavili smo istraživanja terapijskog potencijala protutijela na izoforme BMP1-3. Pritom smo dodatno utvrdili da novoproducirana monoklonska protutijela

primijenjena u životinjskim modelima akutnog infarkta miokarda (podvezivanje koronarne arterije) bitno smanjuju specifične enzime srca, indikatore oštećenja srčanog tkiva. Ehokardiografska analiza pokazala je da su 21. i 45. dan nakon podvezivanja koronarne arterije ejeckijska frakcija (EF) i frakcija skraćanja (FS) u štakora tretiranih s navedenim protutijelom za 40% bolje od funkcije životinja s AIM koje nisu primale terapiju protutijelima.

Iz navedenih rezultata proizlazi da je inhibiranje aktivnosti cirkulirajućeg BMP1-3 dovelo do poboljšanja funkcionalnog kapaciteta srca. Uočili smo smanjenu štetu od okluzije koronarne arterije na miokard te budućeg upalnog odgovora na hipoksiju i posljedično remodeliranje izvanstaničnog matriksa u cijeljenju srčanog mišića upravo primjenom protutijela na BMP1-3. Uzevši u obzir hipotezu da je BMP1-3 jedna od središnjih molekula u fazi nastanka fibroze, nedvojbeno je dokazano da njegovo suprimiranje može imati znatan utjecaj na cijeljenje organa i njihovu funkciju.

U skladu s dosadašnjim istraživanjima naše rezultate možemo tumačiti kao jasan pokazatelj smjera daljnjih istraživanja u pokušaju inhibicije djelovanja molekule BMP1-3. Dokazano je da svako povećanje koncentracije tog proteina izravno utječe na remodeliranje ECCM bez obzira na organ kojim se istraživanje bavi.

Istraživanje svake molekule ili procesa u fibroznom odgovoru ciljanjem na specifične molekule na tom putu može bitno promijeniti patofiziološki proces fibroze ili znatno umanjiti njezine posljedice. Upravo navedene molekule predstavljaju novu terapijsku mogućnost za bolesnike s AIM, svojom dvojakom ulogom: povećavajući preživljenje miocita nakon AIM te sprječavanjem posljedica.

Inhibicija specifičnim monoklonskim protutijelom molekula ključnih u procesu fibrogeneze dovest će do smanjenja fibroze i njezina štetnog utjecaja. Budući da izoforme BMP-a postoje u raznim organima te da su određene izoforme i specifične za pojedini organ, daljnja istraživanja u inaktivaciji i inhibiciji njihova djelovanja specifičnim protutijelima zasigurno imaju budućnost.

## 7. ZAKLJUČAK

1. Postavljeni model infarkta miokarda u štakora zadovoljavajući je i pouzdan eksperimentalni model. Laboratorijske vrijednosti specifičnih srčanih enzima, ultrazvučno mjereni parametri te histološka analiza jasno upućuju na razvoj infarkta kod svih životinja kao posljedicu okluzije koronarne arterije.

2. Laboratorijske vrijednosti specifičnih srčanih enzima te izmjereni ultrazvučni parametri funkcije srca u životinja koje su primile 15 µg/kg specifičnog protutijela na molekulu BMP1-3, pokazuju značajno manje oštećenje miokarda poslije AIM kao i uredniju srčanu funkciju usporedivu s onom u zdravih životinja.

3. Učinci protutijela BMP 1-3 na razvoj fibroze i ožiljka još su jasniji kad životinje liječene protutijelima usporedimo sa životinjama s izazvanim AIM bez terapije. Te životinje pokazuju znatan otklon od urednih laboratorijskih vrijednosti srčanih enzima te znatno lošija srčana funkcija na osnovi mjerenja ultrazvučnih parametara.

4. Ciljno djelovanje protutijelima na molekulu BMP1-3 jasno dokazuje njezino veliko značenje u procesu fibroze i remodeliranja miokarda te njezin daljnji utjecaj na funkciju srca.

## 8. SAŽETAK

Infarkt miokarda vodeći je uzrok smrti u muškaraca i žena te predstavlja jedan od najznačajnijih zdravstvenih problema razvijenog svijeta. Nekroza miokarda događa se zbog neravnoteže između potrebe miokarda za kisikom i opskrbe koju osigurava koronarna cirkulacija. Srčano zatajenje nakon infarkta miokarda uobičajeno je kliničko stanje s visokom smrtnošću.

Opisana je uska povezanost između srčanog zatajenja i procesa remodeliranja miokarda. Glavni ciljevi postojeće terapije jesu brza tromboliza, opskrba kisikom, redukcija srčanog rada i kontrola boli. Postoji velika potreba za novom, snažnom antifibrotičnom terapijom.

Koštani morfogenetski proteini (BMP) skupina su molekula otkrivena prvenstveno u koštanom, ali i u drugim tkivima. Izoforme BMP1 otkrivene su u zdravih dobrovoljaca i bolesnika s raznim morbiditetima. U štakora s kroničnim bubrežnim zatajenjem BMP1-3 potiče renalnu fibrozu, dok terapija s neutralizirajućim BMP1-3 protutijelom reducira fibrozu bubrega. BMP1 izoforme također su otkrivene u krvi pacijenata s akutnim infarktom miokarda.

Uspjeli smo dokazati uspješnost inhibicije BMP1-3 specifičnim protutijelom, kao ključne molekule u procesu fibroze u modelu akutnog srčanog infarkta u štakora. Rezultati su pokazali smanjenje veličine srčanog mišića zahvaćene fibroznim promjenama, smanjene posljedice remodeliranja miokarda kao i značajno poboljšanje funkcije srca.

U evaluaciji terapije koristili smo analizu srčanih enzima u serumu, ehokardiografsku obradu funkcije srca i histološku analizu preparata srčanog mišića nakon podvezivanja koronarne arterije i početka terapije.

Ključne riječi: infarkt miokarda, koštani morfogenetski proteini, fibroza



## 9. SUMMARY

### ***Bone morphogenetic protein impact on myocardial remodelling in acute myocard infarction rat model***

**Bruno Cvjetičanin, 2015.**

Myocardial infarction (MI) is the leading cause of death in both men and women and represents one of the most severe health problem in a modern world. Myocardial necrosis is caused by critical imbalance between the coronary oxygen supply and the demand of the myocardium. Heart failure after MI is a common clinical syndrome with high mortality.

Left ventricular remodeling after MI involves expansion of the infarcted area, ventricular dilatation and thinning of the ventricular wall. The main goals of standard therapy are rapid thrombolysis, optimization of oxygen, reduction of cardiac workload and pain control. There is great need for novel, powerful antifibrotic therapy.

Bone morphogenetic proteins (BMP) are molecules discovered in bones and other different tissues. BMP1 isoforms were discovered in healthy humans and in patients with numerous diseases. In rats with chronic kidney disease administration of BMP1-3 increased renal fibrosis, while therapy with BMP1-3 neutralizing antibody reduced renal fibrosis. BMP1 isoforms were also identified in patients with acute myocardial infarction.

We succeeded in performing the inhibition of the BMP1-3 isoforme with specific antibody as a key role molecule in fibrose process in an acute myocardial infarction in rats. Our results confirmed high efficiency in reducing the area of the heart muscle affected by fibrous changes, noted reduced effect of heart remodeling as well as a significant improvement in heart function.

We evaluated the therapy by using the measurement of cardiac enzyme levels, echocardiographic analysis of cardiac function and histological analysis of the heart muscle after coronary artery ligation and initiation of the therapy.

**Keywords:** myocardial infarction, bone morphogenetic protein, fibrosis

## 10. LITERATURA

1. Pocock, Gillian Human Physiology. Oxford University Press 2006. p. 264.
2. Anatomija čovjeka, Medicinska naklada, J. Krmpotić Nemančić, 2002.
3. Specijalna patologija, Ivan Damjanov i sur. Medicinska naklada, 2004
4. Heart Size in Inbred Strains of Rats ,Cardiovascular DNA and RNA Contents during the Development of Cardiac Enlargement in Rats ,Hisao Tanase et al, , Hypertension,1982, vol 4, no 6, 872-875,
5. The comparative anatomy of the blood supply of cardiac ventricles in the albino rat and guinea-pig S.H.Ahmed et al., J.Anat. 1978, 126, 1, 51-55
6. Hales PW1, Schneider JE, Burton RA, Wright BJ, Bollensdorff C, Kohl P.:Histo-anatomical structure of the living isolated rat heart in two contraction states assessed by diffusion tensor MRI.; Prog Biophys Mol Biol. 2012 Oct-Nov;110(2-3):319-30
7. French JK, White HD. Clinical implications of the new definition of myocardial infarction. Heart 2004; 90:99-106.
8. The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee. Myocardial infarction redefined—A consensus document of the Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. Eur Heart J. 2000;21:1502-1513
9. Thygesen K., Alpert J.S., White H.D.;Joint ESC/ACCF/AHA/WHF Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. Eur Heart J. 2007;28:2525-2538
10. Third Universal Definition of Myocardial Infarction. J Am Coll Cardiol. 2012;60(16):1581-1598.
11. Weaver WD, Simes RJ, Betriu A, Grines CL, Zijlstra F, Garcia E, et al. Comparison of primary coronary angioplasty and intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review. JAMA 1997;278:2093-8
12. Kastrati A, Dibra A, Spaulding C, Laarman GJ, Menichelli M, Valgimigli M, et al. Meta-analysis of randomized trials on drug-eluting stents vs. bare-metal stents in patients with acute myocardial infarction. Eur Heart J 2007;28:2706-13
13. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL (eds): Robbins Pathologic Basis of Disease. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1994.
14. 7. National Heart, Lung, and Blood Institute. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure <http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/hypertension/>

15. Heart Disease and Stroke Statistics - 2014 Update. *Circulation*. 2014;129:e28-e292
16. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics—2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2012;125:188–197
17. Ćorić T, Miler A. Izvješće o umrlim osobama u Hrvatskoj u 2013. godini
18. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001; 104 (3): 365-372.
19. Corti R, Fuster V, Badimon J et al. New understanding of atherosclerosis (clinically and experimentally) with evolving MRI technology in vivo. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;947:181-195
20. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med*. 1992;326(5):310-318
21. Davies MJ, Richardson PD, Woolf N et al. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J*. 1993;69(5):377-381
22. Tanaka A, Shimada K, Sano T, et al. Multiple plaque rupture and C-reactive protein in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2005. May 17;45(10):1594-1599 Epub 2005 Apr 25
23. Webster MWI, Chesebro JH, Smith HC, et al. Myocardial infarction and coronary artery occlusion: a prospective 5-year angiographic study. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15:218A
24. Mizuno K, Satumo K, Miyamoto A, et al. Angioscopic evaluation of coronary artery thrombi in acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 1992;326(5):287-291
25. Arbustini E, Dal Bello B, Morbini P, Burke AP, Bocciarelli M, Specchia G, et al. Plaque erosion is a major substrate for coronary thrombosis in acute myocardial infarction. *Heart*. Sep 1999;82(3):269-72.
26. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndromes of the European Society of Cardiology. *European Heart Journal* (2007) 28, 1598–1660.
27. Canto JG, Fincher C, Kiefe CI, Allison JJ, Li Q, Funkhouser E, Centor RM, Selker HP, Weissman NW. Atypical presentations among Medicare beneficiaries with unstable angina pectoris. *Am J Cardiol* 2002;90:248–253.
28. Fox KA, Carruthers KF, Dunbar DR et al. Underestimated and underrecognized: the late consequences of acute coronary syndrome (GRACE UK– Belgian Study). *Eur Heart J* 2010;31:2755–2764.
29. Diercks DB, Peacock WF, Hiestand BC et al. Frequency and consequences of recording an electrocardiogram . 10 min after arrival in an emergency room in non-ST-segment elevation acute coronary

- syndromes (from the CRUSADE Initiative). *Am J Cardiol* 2006;97:437–442.
30. Cannon CP, McCabe CH, Stone PH et al. The electrocardiogram predicts one-year outcome of patients with unstable angina and non-Q wave myocardial infarction: results of the TIMI III Registry ECG Ancillary Study. *Thrombolysis in Myocardial Ischemia. J Am Coll Cardiol* 1997;30:133–140.
  31. Holmvang L, Clemmensen P, Lindahl B et al. Quantitative analysis of the admission electrocardiogram identifies patients with unstable coronary artery disease who benefit the most from early invasive treatment. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:905–915.
  32. McCarthy BD, Wong JB, Selker HP. Detecting acute cardiac ischemia in the emergency department: a review of the literature. *J Gen Intern Med* 1990;5:365–373/ and /Rouan GW, Lee TH, Cook EF, et al. Clinical characteristics and outcome of acute myocardial infarction in patients with initially normal or nonspecific electrocardiograms (a report from the Multicenter Chest Pain Study). *Am J Cardiol* 1989;64:1087–1092.
  33. Eggers KM, Oldgren J, Nordenskjold A, Lindahl B. Diagnostic value of serial measurement of cardiac markers in patients with chest pain: limited value of adding myoglobin to troponin I for exclusion of myocardial infarction. *Am Heart J* 2004;148:574–581.
  34. Hamm CW, Goldmann BU, Heeschen C et al. Emergency room triage of patients with acute chest pain by means of rapid testing for cardiac troponin T or troponin I. *N Engl J Med* 1997;337:1648–1653.
  35. Cheitlin MD, Armstrong WF, Aurigemma GP et al. ACC/AHA/ASE 2003 guideline update for the clinical application of echocardiography: summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/ASE Committee to Update the 1997 Guidelines for the Clinical Application of Echocardiography). *Circulation* 2003;108:1146–1162.
  36. Kwong RY, Schussheim AE, Rekhraj S et al. Detecting acute coronary syndrome in the emergency department with cardiac magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003;107:531–537.
  37. Udelson JE, Beshansky, Ballin D et al, Myocardial perfusion imaging for evaluation and triage of patients with suspected AMI, *JAMA* 2002, 288, 2693-2700.
  38. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. The Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC) *European Heart Journal* (2012) 33, 2569–2619

39. Hackett D, Davies G, Chierchia S, Maseri A. Intermittent coronary occlusion in acute myocardial infarction. Value of combined thrombolytic and vasodilator therapy. *N Engl J Med* 1987;317:1055–1059.
40. Berger AK, Schulman KA, Gersh BJ, Pirzada S, Breall JA, Johnson AE, et al. Primary coronary angioplasty vs thrombolysis for the management of acute myocardial infarction in elderly patients. *JAMA* 1999;282:341-8
41. Weaver WD, Simes RJ, Betriu A, Grines CL, Zijlstra F, Garcia E, et al. Comparison of primary coronary angioplasty and intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review. *JAMA* 1997;278:2093-8
42. Canadian Cardiovascular Society; American Academy of Family Physicians, American College of Cardiology; American Heart Association, Antman EM, Hand M, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Halasyamani LK, et al. 2007 focused update of the ACC/AHA 2004 guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:210-47
43. Jolly SS, Yusuf S, Cairns J et al. Radial vs. femoral access for coronary angiography and intervention in patients with acute coronary syndromes (RIVAL): a randomised, parallel group, multicentre trial. *Lancet* 2011;377:1409–1420./ and / Romagnoli E, Biondi-Zoccai G, Sciahbasi A et al. Radial vs. femoral randomized investigation in ST elevation acute coronary syndromes: The RIFLE STEACS study. *J Am Coll Cardiol* 2012
44. Kastrati A, Dibra A, Spaulding C, Laarman GJ, Menichelli M, Valgimigli M, et al. Meta-analysis of randomized trials on drug-eluting stents vs. bare-metal stents in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2007;28:2706-13.
45. Co M, Tay E, Lee CH, Low A, Teo SG, Poh KK, et al. Endothelial progenitor cell capture stent (Genous Bio-Engineered R Stent) during primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction: intermediate-to long-term clinical follow-up. *American Heart Journal* 2008;155:128-32.
46. Indications for fibrinolytic therapy in suspected acute myocardial infarction: collaborative overview of early mortality and major morbidity results from all randomised trials of more than 1000 patients. Fibrinolytic Therapy Trialists' (FTT) Collaborative Group. *Lancet* 1994;343:311–322.
47. Erlemeier HH, Zangemeister W, Burmester L, Schofer J, Mathey DG, Bleifeld W. Bleeding after thrombolysis in acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 1989;10:16-23

48. ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. The Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology (ESC) *European Heart Journal* (2012) 33, 2569–2619.
49. Cotter G, Faibel H, Barash P, Shemesh E et al. High-dose nitrates in the immediate management of unstable angina: optimal dosage, route of administration, and therapeutic goals. *Am J Emerg Med* 1998;16:219–224.
50. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal* (2011) 32, 2999–3054
51. Harrington RA, Becker RC, Cannon C et al. Antithrombotic therapy for non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* 2008;133: 670S–707S
52. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. The Task Force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal* (2011) 32, 2999–3054
53. White HD, Cross DB, Elliott JM, Norris RM, Yee TW. Long-term prognostic importance of patency of the infarct-related coronary artery after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *Circulation* 1994; 89:61–67.
54. the APEX AMI Investigators. Pexelizumab for acute ST-elevation myocardial infarction in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007; 297:43–51.
55. Bloch Thomsen PE, Jons C, Raatikainen MJ, Moerch Joergensen R, Hartikainen J, Virtanen V, et al. Long-term recording of cardiac arrhythmias with an implantable cardiac monitor in patients with reduced ejection fraction after acute myocardial infarction: the Cardiac Arrhythmias and Risk Stratification After Acute Myocardial Infarction (CARISMA) study. *Circulation*. Sep 28 2010;122(13):1258-64
56. Eagle KA, Guyton RA, Davidoff R, et al. ACC/AHA 2004 guideline update for coronary artery bypass graft surgery: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to Update the 1999

- Guidelines for Coronary Artery Bypass Graft Surgery). *Circulation* 2004; 110:e340
57. Goldberg RJ, Spencer FA, Gore JM et al. Thirty-year trends (1975 to 2005) in the magnitude of, management of, and hospital death rates associated with cardiogenic shock in patients with acute myocardial infarction: a population-based perspective. *Circulation* 2009;119:1211–1219
  58. Picard MH, Davidoff R, Sleeper LA et al. Echocardiographic predictors of survival and response to early revascularization in cardiogenic shock. *Circulation* 2003;107:279–284.
  59. Stevenson WG, Linssen GC, Havenith MG, et al. The spectrum of death after myocardial infarction: a necropsy study. *Am Heart J* 1989; 118:1182
  60. Levine RA, Schwammenthal E. Ischemic mitral regurgitation on the threshold of a solution: from paradoxes to unifying concepts. *Circulation* 2005; 112:745
  61. Stokman PJ, Nandra CS, Asinger RW. Left ventricular thrombus. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2001; 3:515–521. / i / Mollet NR, Dymarkowski S, Volders W, et al. Visualization of ventricular thrombi with contrast-enhanced magnetic resonance imaging in patients with ischemic heart disease. *Circulation* 2002; 106:2873–2876.
  62. Shahar A, Hod H, Barabash GM, Kaplinsky E, Motro M. Disappearance of a syndrome: Dressler's syndrome in the era of thrombolysis. *Cardiology* 1994; 85:255–258.
  63. Chow CK, Jolly S, Rao-Melacini P, Fox KA, Anand SS, Yusuf S. Association of diet, exercise, and smoking modification with risk of early cardiovascular events after acute coronary syndromes. *Circulation* 2010;121:750–758.
  64. Thomson CC, Rigotti NA. Hospital- and clinic-based smoking cessation interventions for smokers with cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 2003;45: 459–479./
  65. Zannad F, McMurray JJ, Krum H et al. Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms. *N Engl J Med* 2011;364:11–21.
  66. Reiner Z, Catapano AL, De Backer G et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: the Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Eur Heart J* 2011;32:1769–1818.
  67. Rosamond WD, Chambless LE, Folsom AR, et al. Trends in the incidence of myocardial infarction and in mortality due to coronary heart disease, 1987 to 1994. *N Engl J Med* 1998; 339:861.; Heidenreich PA, McClellan M. Trends in treatment and outcomes for acute myocardial infarction: 1975-1995. *Am J Med* 2001; 110:165

68. Roe MT, Messenger JC, Weintraub WS, et al. Treatments, trends, and outcomes of acute myocardial infarction and percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56:254
69. Roe MT, Messenger JC, Weintraub WS, et al. Treatments, trends, and outcomes of acute myocardial infarction and percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol* 2010; 56:254
70. Furman MI, Dauerman HL, Goldberg RJ, et al. Twenty-two year (1975 to 1997) trends in the incidence, in-hospital and long-term case fatality rates from initial Q-wave and non-Q-wave myocardial infarction: a multi-hospital, community-wide perspective. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37:1571
71. Urist MR. Bone formation by autoinduction. *Science* 1965; 150: 893-899
72. Vukičević S, Stavljenić A, Pećina M. Discovery and clinical applications of bone morphogenetic proteins. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995; 33: 661-71
73. Martinovic S, Borovecki F, Smpath KT, Vukicevic S. Biology of bone morphogenetic proteins, u *Bone Morphogenetic Proteins: From Laboratory to Clinical Practice*. urednici Vukicevic S, Smpath KT, izdavač Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2002; 87-119
74. Reddi AH. Role of morphogenetic proteins: From basic studies to clinical approaches. *Bone* 1998; 22: 591-603
75. Kingsley DM. The TGF- $\beta$  superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994; 8:133-46
76. Griffith DL, Keck PC, Smpath TK, Rueger DC, Carlson WD. Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: Structural paradigm for the transforming growth factor  $\beta$  superfamily. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 878-883/ Ozkaynak E, Schneegelsberg PN, Oppermann H. Murine osteogenic protein (OP-1) High levels of mRNA in kidney. *Biochem Biophys Res Comm* 1991; 179: 116-123
77. Rueger DC. Biochemistry of bone morphogenetic proteins. U *Bone Morphogenetic Proteins: From Laboratory to Clinical Practice*. urednici Vukicevic S, Smpath KT, izdavač Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2002; 1-18.
78. Demers C, Hamdy R. Bone morphogenetic proteins. *Science Medicine* 1999; 6: 8-17.
79. Korchynsky O, vanBezooijen RL, Lowik CWGM, tenDijke P. Bone morphogenetic protein receptors and their nuclear effectors in bone formation, u *Bone Morphogenetic Proteins: Regeneration of Bone and beyond*. Urednici Vukicevic S, Smpath KT, izdavač Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2004; 9-44
80. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massagué J. Mechanism of activation of the TGF- $\beta$  receptor. *Nature* 1994; 370:341-7



81. Heldin CH, Miyazono K, tenDijke P. TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus through Smad proteins. *Nature* 1997; 390:465-71
82. Carcamo J, Weis FM, Ventura F, Weiser R, Wrana JL, Attisano L, Massague J. Type I receptors specify growth inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor beta and activin. *Mol Cell Biol* 1994; 14(6): 3810-21
83. tenDijke Y, Yamashita H, Sampath TK et al. Identification of type-I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. *J Biol Chem* 1994; 269: 16985- 88
84. Sieber C, Schwaerzer GK, Knaus P. Bone morphogenetic protein signaling is fine tuned on multiple levels. U: *Bone Morphogenetic Proteins: From local to systemic therapeutics*. Urednici Vukicevic S, Sampath KT, izdavač Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2008; 281-114.
85. Hayashi K, Ishidou Y, Yonemori K et al. Expression and localisation of bone morphogenetic proteins (BMP) and BMPs receptors in ossification of the ligamentum flavum. *Bone* 1997; 21: 23-30.
86. Piccolo S, Ssi Y, Lu B, De Robertis EM. Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* 1996; 86:589-598.
87. Simic P, Vukicevic S. Bone morphogenetic proteins in development. U: *Bone Morphogenetic Proteins: Regeneration of Bone and beyond*. Urednici Vukicevic S, Sampath KT, izdavač Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2004; str.73-108
88. Hogan BLM. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* 1996; 10: 1580-1594.
89. Korchynsky O, vanBezooijen RL, Lowik CWGM, tenDijke P. Bone morphogenetic protein receptors and their nuclear effectors in bone formation, u *Bone Morphogenetic Proteins: Regeneration of Bone and beyond*. Urednici Vukicevic S, Sampath KT, izdavač Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2004; 9-44.
90. Liaw L, Birk DE, Ballas CB et al. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). *J Clin Invest* 1998; 101:1468-78.
91. Vukicevic S, Latin V, Chen P, Batorsky R, Reddi A.H, Localization of osteogenic protein-1(bone morphogenetic protein -7) during human embryonic development, *Bioch. Biophys. Resear. Commun* 1994: 198: 693-700.
92. Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN et al. Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development* 2003; 130: 2779-91.
93. Galvin KM, Donovan MJ, Lynch CA et al. A role of smad 6 in development and homeostasis of the cardiovascular system. *Nat Genet* 2000; 24: 171-4.

94. Vukicevic S, Simic P, Grgurevic L, Borovecki F, Sampath K. Systemic administration of bone morphogenetic proteins. U: Bone Morphogenetic Proteins: From Local to Systemic Therapeutics, Izdavač Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2008; 317-37.
95. Burkus JK. Clinical outcomes using rhBMP-2 in spinal fusion applications. U: Bone Morphogenetic Proteins: From Local to Systemic Therapeutics, Izdavač Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2008; 71-80.
96. Ozkaynak E, Rueger DC, Drier EA, Corbett C, Ridge RJ, Smpath TK, Oppermann H. OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF- $\beta$  family. EMBO J 1990; 9: 2085-2093.
97. Vukicevic S, Basic V, Rogic D, Bašić N, Shih MS, Shepard A, Jin D, Dattatreya Murthy B, Jones W, Dorai H, Ryan S, Griffiths D, Maliakal J, Jelic M, Pastorcic M, Stavljenic A, Smpath TK. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) reduces severity of injury after ischemic acute renal failure in rat. J Clin Invest 1998; 102: 202-14.
98. Lefer AM, Tsao PS, Ma XL, Sampath TK. Anti-ischaemic and endothelial protective actions of recombinant human osteogenic protein (hOP-1). J Mol Cell Cardiol 1992; 24: 585-93.
99. Chan CF, Lin SZ, Chiang YH et al. Intravenous administration of bone morphogenetic protein -7 after ischemia improves motor functions in stroke rats. Stroke 2003; 34: 558- 64.
100. Heldin CH, Miyazono K, tenDijke P. TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus through Smad proteins. Nature 1997; 390: 465-71.
101. Clement JH, Wolfl S. Bone morphogenetic proteins and cancer. U: Bone Morphogenetic Proteins: Regeneration of Bone and beyond. edit. Vukicevic S, Smpath KT, izdavač Birkhauser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 2004; 267.
102. Sekiya T, Adachi S, Kohu K et al. Identification of BMP and activine membrane- bound inhibitor (BAMBI), an inhibitor of transforming growth factor beta signaling , as a target of the beta-catenin pathway in colorectal tumor cells. J Biol Chem 2004; 279: 6840-6.
103. Katoh M, Terada M. Overexpression of bone morphogenetic protein 4 (BMP-4) mRNA in gastric cancer cell lines of poorly differentiated type. J Gastroenterol 1996; 345.1: 137- 9.
104. Liu X, Lee J, Cooley M et al. Smad7 but not Smad6 cooperate with oncogenic to cause malignant conversion in a mouse model for squamous cell carcinoma. Cancer Res 2003; 63: 7760-8.
105. Urist MR. Bone formation by autoinduction. Science 1965; 150: 893-899.
106. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science 1988;242:1528-1534.

107. Kessler E, Takahara K, Biniaminov L, Brusel M, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science* 1996; 271: 360-362.
108. Hopkins DR, Keles S, Greenspan DS. The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases. *Matrix Biology* 2007; 27: 508-23.
109. Stocker W, Gomisruth FX, Bode W, Zwillig R. Implications of the 3-D structure of astacin for the structure and function of the astacin family of zinc-endopeptidases. *Eur J Biochem* 1993; 214: 215-31.
110. Baumann U. Crystal structure of the 50 kDa metalloproteinase from *Serratia marcescens*. *J Mol Biol* 1994; 242: 244-51.
111. Shimell MJ, Ferguson EL, Childs SR et al. The *Drosophila* dorsal-ventral patterning gene *tolloid* is related to human bone morphogenetic protein 1. *Cell* 1991; 67: 469-81.
112. Mohrlen F, Hutter H, Zwillig R. The astacin protein family in *Caenorhabditis elegans*. *Eur J Biochem* 2003; 270: 4909-4920.
113. Janitz M, Heiser V, Böttcher U, Landt O, Lauster R. Three alternatively spliced variants of the gene coding for the human bone morphogenetic protein-1. *J Mol Med* 1998; 76: 141-6.
114. Janitz M, Heiser V, Böttcher U, Landt O, Lauster R. Three alternatively spliced variants of the gene coding for the human bone morphogenetic protein-1. *J Mol Med* 1998; 76: 141-6.
115. Scott IC, Imamura Y, Pappano WN et al. Bone morphogenetic protein 1 process probiglycan. *J Biol Chem* 2000; 275: 30505-30511.
116. Suzuki N, Labosky PA, Furuta Y, Hargett L et al. Failure of ventral body wall closure in mouse embryos lacking a procollagen C-proteinase encoded by *Bmp1*, a mammalian gene related to *Drosophila* *tolloid*. *Development* 1996; 122: 3587-3595.
117. Clark TG, Conway SJ, Scott IC, Labosky PA. The mammalian *Tolloid*-like 1 gene *Tll1* is necessary for normal septation and positioning of the heart. *Development* 1999; 126: 2631-2642.
118. Stanczak P, Witecka J, Szydio A et al. Mutations in mammalian *tolloid*-like 1 gene detected in adult patients with ASD. *Eur. J. Hum Genet.* 2009; 17: 344-351.
119. Wermter C, Howel M, Hintze V et al. The protease domain of procollagen C-proteinase (BMP1) lacks substrate selectivity which is conferred by non-proteolytic domains. *Biol Chem* 2007; 382: 513-521.
120. Wardle FC, Welch JV, Dale L. Bone morphogenetic protein 1 regulates dorsoventral patterning in early *Xenopus* embryos by degrading Chordin, a BMP4 antagonist. *Mech Dev* 1999; 75: 75-85.
121. Grgurevic L, Macek B, Mercep M, Jelic M et al. Bone Morphogenetic protein (BMP)1-3 enhances bone repair, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2011; 408, 25-31.
122. Grgurevic L, Macek B, Healy D, Brault A et al. Circulating Bone Morphogenetic Protein 1–3 Isoform Increases Renal Fibrosis *J Am Soc*

- Nephrol, 2011, 21, 681-692.
123. Patologija, Ivan Damjanov i sur. Medicinska naklada 2014
  124. Nag AC. Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios.* 1980;28:41–61
  125. Eghbali M, Czaja MJ, Zeydel M, et al. Collagen chain mRNAs in isolated heart cells from young and adult rats. *J Mol Cell Cardiol.* 1988;20: 267–276.
  126. Alberts B, Bray D, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell.* 3rd ed. New York, NY: Garland Publishing; 1994.22; 33-39.
  127. Eghbali M, Blumenfeld OO, Seifter S, et al. Localisation of types I, III, and IV collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridization. *J Mol Cell Cardiol.* 1989;21:103–113.
  128. Olivetti G, Capasso JM, Sonnenblick EH, et al. Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myo- cardiac infarction in rats. *Circ Res.* 1990;67:23–34.
  129. Caulfield JB, Borg TK. The collagen network of the heart. *Lab Invest.* 1979;40:364 –372.
  130. Jugdutt BI. Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways. *Curr Drug Targets Car- diovasc Haematol Disord.* 2003;3:1–30
  131. Tyagi SC. Proteinases and myocardial extracellular matrix turnover. *Mol Cell Biochem.* 1997;168:1–12.
  132. Jeffrey JJ. Collagen degradation. In: Cohen IK, Diegelmann RF, Lindblad WJ, eds. *Wound Healing: Biochemical and Clinical Aspects.* Philadelphia, Pa: WB Saunders Co; 1992:177–194.
  133. Tyagi SC, Kullar SG, Banks J, et al. Co-expression of tissue inhibitor and matrix metalloproteinase in myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 1995;27: 2177–2189.
  134. Kobayashi K, Luo M, Zhang Y, Wilkes DC, Ge G, Grieskamp T, Yamada C, Liu TC, Huang G, Basson CT, Kispert A, Greenspan DS, Sato TN Secreted Frizzled-related protein 2 is a procollagen C proteinase enhancer with a role in fibrosis associated with myocardial infarction. *Nat Cell Biol* 2009; 11:46-55.
  135. He W, Zhang L, Ni A, Zhang Z, Mirotso M, Mao L, Pratt RE, Dzau VJ Exogenously administered secreted frizzled related protein 2 (Sfrp2) reduces fibrosis and improves cardiac function in a rat model of myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107:21110-5.

## 11. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 3. kolovoza 1975. godine. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisujem 1994. Diplomirao sam 2000. godine a doktorski znanstveni poslijediplomski studij upisao sam 2002. godine. Završio sam specijalizaciju iz opće kirurgije 2007. godine te subspecijalizaciju iz plastično-rekonstruktivne i estetske kirurgije 2010. Od 2011. stalno sam zaposlen kao subspecijalist na Zavodu za plastično-rekonstruktivnu kirurgiju i kirurgiju dojke, Klinike za kirurgiju, KBC Zagreb.

U ljeto 2005. godine dobio sam znanstvenu stipendiju Republike Francuske za istraživanje te sam proveo 3 mjeseca u znanstveno-istraživačkom laboratoriju u Institutu Necker-Enfants Malades u Parizu pod vodstvom akademika Miroslava Radmana.

Od 2012. pridruženi sam član istraživačkog tima u Laboratoriju za mineralizirana tkiva Zavoda za anatomiju Medicinskoga fakulteta pod vodstvom akademika Slobodana Vukičevića.

Tijekom usavršavanja iz plastično-rekonstruktivne kirurgije boravio sam kao gost liječnik u Univerisitätsklinik Zürich te Dreifaltigskleit Klinik kod Koelna.

Kao djelatnik Zavoda za plastičnu kirurgiju sudjelovao sam u organizaciji nekoliko radionica s međunarodnim sudjelovanjem "Croatian Breast Academy" koje su se održale u Kliničkom bolničkom centru Zagreb.

Učesnik sam brojnih stranih i domaćih kongresa i simpozija iz područja plastično-rekonstruktivne i estetske kirurgije kao i iz opće kirurgije, aktivno s usmenim izlaganjima, posterima i kongresnim sažetcima te kao slušač.

Sudjelovao sam u objavljivanju 8 znanstvenih radova, kao prvi autor ili koautor, objavljenim u časopisima indeksiranim u „Current Contentsu” te u objavljivanju nekoliko radova u drugdje indeksiranim časopisima.

Član sam Hrvatkoga liječničkog zbora, Hrvatskoga kirurškoga društva te Hrvatskoga društva za plastičnu, rekonstruktivnu i estetsku kirurgiju.

Govorim engleski, njemački, talijanski i francuski jezik.